



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

**Caracterización citológica de la médula ósea durante el
desarrollo fetal en la alpaca (*Vicugna pacos*)**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Elvis Joan CALDERÓN FERNÁNDEZ

ASESOR

Dr. Juan Antonio ESPINOZA BLANCO

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Calderón, E. Caracterización citológica de la médula ósea durante el desarrollo fetal en la alpaca (*Vicugna pacos*) [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2018.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

CÓDIGO ORCID DEL ASESOR:

- Juan Antonio Espinoza Blanco: 0000-0003-3945-6200

DNI DEL AUTOR:

- Elvis Joan Calderón Fernández: 47871529

FINANCIAMIENTO:

- Autofinanciado

UBICACIÓN GEOGRÁFICA DONDE SE DESARROLLÓ LA INVESTIGACIÓN:

- **Obtención de muestras:** Camal municipal del Distrito de Ninacaca-Pasco- Perú (10,851890°S; 76,110543°W)
- **Procesamiento y análisis de datos:** Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Distrito de San Borja-Lima-Perú (12,081694°S; 76,987716°W)

RANGO DE AÑOS QUE LA INVESTIGACIÓN ABARCÓ:

- Obtención de muestras: 2017
- Procesamiento y análisis de datos: 2018



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el **jueves 29 de noviembre de 2018**, a las **10:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° **0252-EPMV/FMV-2018**, integrado por los siguientes profesores:

QF Mg. Olga Li Elías
MV. Dr. Juan Espinoza Blanco
MV. Gilberto Santillán Altamirano
Dr. MV. William Barrios Santos

Presidente del jurado
Asesor de la Tesis
Miembro del Jurado
Miembro del Jurado

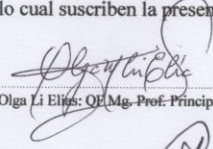
Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Don: **CALDERÓN FERNÁNDEZ, ELVIS JOAN** para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

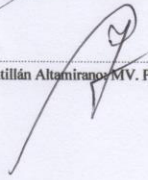
“CARACTERIZACIÓN CITOLÓGICA DE LA MÉDULA ÓSEA DURANTE EL DESARROLLO FETAL EN LA ALPACA (*Vicugna pacos*)”

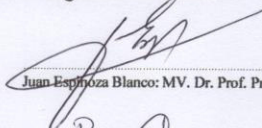
Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECISIETE (17)**.

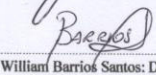
Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **11:20 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:


Olga Li Elías: QF Mg. Prof. Principal, D.E.


Gilberto Santillán Altamirano: MV. Prof. Asociado T.C


Juan Espinoza Blanco: MV. Dr. Prof. Principal D. E.


William Barrios Santos: Dr. MV. Prof. Auxiliar T.C

DEDICATORIA

A Dios, por su amor y presencia en cada uno de mis pasos.

A mis padres Elvis y Juana, por su infinito amor, por su paciencia y comprensión en cada una de mis etapas (especialmente cuando decidí estudiar Medicina Veterinaria) y por predicarme siempre con el ejemplo; su educación siempre ha estado llena de valores gracias a los cuales hoy cumpla cada una de las metas que me propongo.

A mi hermana Janett, por tomarse siempre muy en serio su rol de hermana mayor; dándome consejos y cuidando de mis pasos, no olvidaré nunca, que gracias a su apoyo pude decidirme a estudiar medicina veterinaria; y gracias por darnos a la familia dos bellos niños: Samuel y Sofía.

Al amor que te profesó Evelyn, por el cual cada día aprendemos más y nos superamos mutuamente basándonos en la búsqueda de la felicidad el uno al otro, gracias por apoyarme en cada proyecto que emprendo ¡bendito sea el destino que nos unió!

A la memoria de mi mamita Lila, que con mucho amor y sacrificio sacó adelante a sus hijos.

A las pequeñas Estrella y Canela por su cariño y lealtad, y por siempre recibirme en casa efusivamente luego de cada día agotador.

A la memoria de Milko, Benoni, Lohobo, Canela vieja, Nerón, Ares, Rabito, Sasy, Pico chueco y Tyson,

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Manuel Barrios Arpi por su dedicación, consejos y apoyo, gracias a lo cual se logró realizar el presente trabajo.

Al Doctor Juan Espinoza Blanco por su asesoría y apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

A la municipalidad distrital de Ninacaca y al camal municipal por Brindar las facilidades pertinentes durante la etapa de muestreo.

A la Doctora Olga Li, Luis Hoyos, Álvaro Vásquez, Carlos rivera y la señora Blanca, del laboratorio de Patología Clínica por su inmenso apoyo.

Al Doctor Boris Lira, Doctora María Vásquez y el Señor Juan Huapaya del laboratorio de Fisiología animal por brindarme la ayuda necesaria para culminar con éxito este trabajo.

A mis compañeros, docentes y personal administrativo de la Clínica de Animales Menores, por su apoyo y confianza.

A la música que siempre ha estado para acompañarme en cada etapa de mi vida.

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	vi
RESUMEN	ix
ABSTRACT.....	x
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ANEXOS.....	xiv
I. INTRODUCCIÓN	16
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS.....	17
2.1.1. LA ALPACA	18
2.1.1.1. Taxonomía	19
2.1.2. PARTICULARIDADES ANATÓMICAS Y FISIOLÓGICAS EN CSA	19
2.1.2.1. Adaptación a la hipoxia ambiental	19
2.1.2.2. Nutrición	21
2.1.2.3. Reproducción	21
2.1.3.- GESTACIÓN Y DESARROLLO FETAL EN LA ALPACA	23
2.1.3.1. Duración de la gestación	23
2.1.3.2. Reconocimiento maternal de la gestación	23
2.1.3.3. Desarrollo embrionario y fetal	24
2.2. HEMATOPOYESIS EMBRIONARIA Y FETAL.....	25
2.2.1. HEMATOPOYESIS EMBRIONARIA	26
2.2.1.1. Saco vitelino	26
2.2.1.2. Hemangioblastos	26
2.2.1.3. Eritroblastos primitivos.....	27
2.2.1.4. Linajes no eritroides	28
2.2.2. HEMATOPOYESIS FETAL.....	28
2.2.2.1. Región aorta-gónada-mesonefros (AGM)	29
2.2.2.2. Células madre hematopoyéticas (CMH)	29

2.2.2.3. Hígado.....	29
2.2.2.4. Timo y bazo	30
2.2.2.5. Médula ósea y etapa postnatal	30
2.3. MÉDULA ÓSEA	30
2.3.1. ESTRUCTURA DE SOPORTE.....	31
2.3.1.1. Matriz extracelular	31
2.3.1.2. Osteoblastos y osteoclastos	31
2.3.1.3. Tejido adiposo	32
2.3.1.4. Arquitectura sinusal.....	33
2.3.2. VASCULATURA	33
2.3.3. INERVACIÓN.....	34
2.3.4. ORGANIZACIÓN CELULAR	34
2.3.4.1. Megacariocitos	35
2.3.4.2. Células eritroides	36
2.3.4.2.1. Islas eritroides	36
2.3.4.2.2. Eritropoyesis.....	37
2.2.4.4.- Células linfoides y macrófagos	41
III. MATERIALES Y MÉTODOS	42
3.1. LUGAR Y ÉPOCA DE ESTUDIO	42
3.2. MATERIALES.....	43
3.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO	43
3.2.2. MATERIALES PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS	44
3.2.3. EQUIPOS Y MATERIALES PARA HEMOGRAMA	44
3.2.4. MATERIALES PARA TINCIÓN DE MUESTRAS CITOLÓGICAS.....	44
3.2.5. MATERIALES PARA ANÁLISIS DE MUESTRAS	45
3.3. METODOLOGÍA	45
3.3.1. HEMATOLOGÍA EN HEMBRAS GESTANTES	45
3.3.2. DETERMINACIÓN DE LA EDAD GESTACIONAL	46
3.3.3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS CITOLÓGICAS.....	47
3.3.4. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	50
3.3.5. EVALUACIÓN CITOLÓGICA Y ANÁLISIS DE DATOS.....	50

IV. RESULTADOS	52
4.1. EVALUACIÓN HEMATOLÓGICA DE HEMBRAS GESTANTES	52
4.2. EDAD GESTACIONAL EN FETOS DE ALPACA.....	53
4.3. CELULARIDAD EN MUESTRAS DE MÉDULA ÓSEA.....	54
4.4. MORFOMETRÍA CELULAR.....	56
4.5. IDENTIFICACIÓN CELULAR.....	58
4.6. RECUENTO DIFERENCIAL.....	64
4.7. RELACIÓN MIELOIDE/ERITROIDE.....	67
4.8. ÍNDICE DE MADURACIÓN ERITROIDE Y MIELOIDE.....	68
V. DISCUSIÓN.....	70
VI. CONCLUSIONES.....	75
VII. LITERATURA CITADA	76
VIII. APÉNDICE	87

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo investigar sobre la morfología y morfometría de las células progenitoras de la médula ósea a través del examen citológico durante el desarrollo fetal en la alpaca (*Vicugna pacos*). Se colectaron muestras de médula ósea provenientes de 18 fetos de alpacas clínicamente sanas y destinadas a beneficio en el matadero municipal Ninacaca del departamento de Pasco, Perú. Las muestras fueron colectadas a partir de la sección de la octava y novena costilla tomando como referencia la unión costo-condral y se depositaron en láminas para la preparación de los extendidos citológicos para su posterior tinción con colorante Wright. Los porcentajes de celularidad obtenidas por cada tercio de gestación fueron 16 ± 0.2 , 35 ± 0.16 y 78 ± 0.12 , respectivamente, siendo evidenciadas las primeras células hematopoyéticas a partir de los 201.5 días de edad. Se realizó un conteo diferencial de 500 células para establecer la relación mieloide:eritroide obteniéndose 0 (97% de células indiferenciadas), 0.47 ± 0.27 y 0.69 ± 0.19 para el primer, segundo y último tercio de gestación, respectivamente. Para el segundo tercio de gestación se detectó 10% de células eritroides, 5% de células mieloides y 85% de otros tipos celulares (entre megacariocitos, osteoblastos, osteoclastos, macrófagos y células indiferenciadas) y en el último tercio se observó 40% de células eritroides, 27% de células mieloides y 33% de otros tipos celulares. En relación al examen morfométrico, los resultados revelaron características similares a las encontradas en células hematopoyéticas en otras especies. La evaluación citológica de la médula ósea en fetos de alpaca resultó ser un procedimiento rápido y de gran significancia debido a la contribución de la información obtenida que permitirá continuar con otros estudios de investigación relacionados al tema a fin de comprender el desarrollo y la función de los órganos hematopoyéticos en esta especie durante la etapa fetal.

Palabras clave: alpaca, feto, médula ósea, citología.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the morphology and morphometry of progenitor cells from the bone marrow through cytological examination during fetal development in alpaca (*Vicugna pacos*). Bone marrow samples were obtained from 18 fetuses from clinically healthy alpacas, from discarding and benefited at the Ninacaca Municipal slaughterhouse in the department of Pasco, Peru. The samples were collected from the section of the eighth and ninth ribs taking as reference the costochondral junction and were deposited in sheets for the preparation of cytological smears for subsequent staining with Wright dye. The percentages of cellularity obtained for each third of gestation were 16 ± 0.2 , 35 ± 0.16 and 78 ± 0.12 , respectively, with the first hematopoietic cells evidenced after 201.5 days of age. A differential count of 500 cells was performed to establish the myeloid: erythroid ratio, obtaining 0 (97% of undifferentiated cells), 0.47 ± 0.27 and 0.69 ± 0.19 for the first, second and last third of gestation, respectively. For the second third of gestation 10% of erythroid cells, 5% of myeloid cells and 85% of other cell types were detected (between megakaryocytes, osteoblasts, osteoclasts, macrophages and undifferentiated cells) and in the last third 40% of erythroid cells were observed, 27% of cells Myeloids and 33% of other cell types In relation to the morphometric examination, the results revealed characteristics similar to those found in hematopoietic cells in other species. The cytological evaluation of the bone marrow in alpaca fetuses turned out to be a quick procedure of great significance due to the contribution of the obtained information that will allow to continue with other research studies relac They were introduced to the subject in order to understand the development and function of the hematopoietic organs in this species during the fetal stage.

Key words: alpaca, fetus, bone marrow, cytology.

LISTA DE CUADROS

- **Cuadro 1.** Promedio de valores hematológicos de 18 hembras alpaca gestantes.....53
- **Cuadro 2.** Edad gestacional de 18 fetos de alpaca clasificados según el tercio de gestación (TG).....54
- **Cuadro 3.** Porcentaje de celularidad de muestras de médula ósea de 18 fetos de alpaca, clasificados según el tercio de gestación.....56
- **Cuadro 4.** Promedio de diámetros longitudinal y transversal de los diferentes tipos de células observadas en muestras citológicas de médula ósea de 18 fetos de alpaca de diferentes edades gestacionales.....57
- **Cuadro 5.** Composición porcentual citológica de médula ósea de fetos de alpaca en el primer tercio de gestación.....64
- **Cuadro 6.** Composición porcentual citológica de médula ósea de fetos de alpaca en el segundo tercio de gestación.....67
- **Cuadro 7.** Composición porcentual citológica de médula ósea de fetos de alpaca en el último tercio de gestación.....68
- **Cuadro 8.** Relación Mieloide/Eritroide (M/E) y promedios según el tercio de gestación en 18 fetos de alpaca.....67
- **Cuadro 9.** Índice de maduración eritroide y mieloide en fetos de alpaca en el segundo tercio de gestación.....68
- **Cuadro 10.** Índice de maduración eritroide y mieloide en fetos de alpaca en el último tercio de gestación.....69

LISTA DE FIGURAS

- **Figura 1.** Representación de la hematopoyesis a partir de una célula madre hematopoyética pluripotencial dando origen a diferentes líneas celulares sanguíneas.....35
- **Figura 2.** Isla eritroide a partir de un aspirado citológico de médula ósea37
- **Figura 3.** Puerta principal del camal municipal del distrito de Ninacaca en el departamento de Cerro de Pasco.....43
- **Figura 4.** Preparación del frotis sanguíneo de hembras alpacas gestantes.....46
- **Figura 5.** Medición del diámetro biparietal (DBP): 1.705 centímetros en un feto de alpaca de 75.2 días de edad gestacional.....47
- **Figura 6.** Medición del diámetro biparietal (DBP): 7.25 centímetros en un feto de alpaca de 337.1 días de edad gestacional.47
- **Figura 7.** Exposición del feto de alpaca.....48
- **Figura 8.** Exposición de costilla de feto de alpaca.....49
- **Figura 9.** Colocación de muestra de médula ósea en lámina portaobjeto.....49
- **Figura 10.** Extendido de sangre periférica de hembra alpaca gestante.....52
- **Figura 11.** Celularidad de 15% en extendido citológico de médula ósea en feto de alpaca de 96.2 días.....55
- **Figura 12.** Celularidad de 95% en extendido citológico de médula ósea en feto de alpaca de 337.1 días.....55

- **Figura 13.** Osteoblasto y Osteoclasto en muestra citológica de médula ósea en un feto de alpaca de 334 días.....58
- **Figura 14.** Diferentes células en médula ósea de feto de alpaca de 267.6 días.....59
- **Figura 15.** Diferentes tipos celulares en médula ósea de feto de alpaca de 201.5 días.....59
- **Figura 16.** Diferentes células en médula ósea de feto de alpaca de 311.3 días.....60
- **Figura 17.** (M) Mielocito neutrófilo. (An) Abastonado neutrófilo. En médula ósea de feto de alpaca de 288.4 días.....60
- **Figura 18.** (Ab) Abastonado basófilo. (Ab) Abastonado neutrófilo. En médula ósea fetal de alpaca de 267.6 días.....61
- **Figura 19.** (Ae) Abastonado eosinófilo. (Ab) Abastonado neutrófilo. En médula ósea fetal de alpaca de 251.3 días.....61
- **Figura 20.** Megacariocito en médula ósea fetal de alpaca de 337.1 días.....62
- **Figura 21.** Megacariocito en médula ósea fetal de alpaca de 334 días.....62
- **Figura 22.** Célula linfoide en médula ósea fetal de alpaca de 334 días.....63
- **Figura 23.** Macrófago y células indiferenciadas en médula ósea fetal de alpaca de 86.2 días.....63

LISTA DE ANEXOS

- **Apéndice 1.** Resultados del hemograma completo de 18 hembras alpacas gestantes de descarte y beneficiadas en el Camal Municipal de Ninacaca, Pasco.....88
- **Apéndice 2.** Recuento diferencial de muestras citológicas de médula ósea en fetos de alpaca pertenecientes al primer tercio gestacional.....89
- **Apéndice 3.** Recuento diferencial de muestras citológicas de médula ósea en fetos de alpaca pertenecientes al segundo tercio gestacional (F-04, F-05 y F-06).....90
- **Apéndice 4.** Recuento diferencial de muestras citológicas de médula ósea en fetos de alpaca pertenecientes al segundo tercio gestacional (F-07 y F-08).....91
- **Apéndice 5.** Recuento diferencial de muestras citológicas de médula ósea en fetos de alpaca pertenecientes al último tercio gestacional (F-09 y F-10).....92
- **Apéndice 6.** Recuento diferencial de muestras citológicas de médula ósea en fetos de alpaca pertenecientes al último tercio gestacional (F-11 y F-12).....93
- **Apéndice 7.** Recuento diferencial de muestras citológicas de médula ósea en fetos de alpaca pertenecientes al último tercio gestacional (F-13 y F-14).....94
- **Apéndice 8.** Recuento diferencial de muestras citológicas de médula ósea en fetos de alpaca pertenecientes al último tercio gestacional (F-15 y F-16).....95
- **Apéndice 9.** Recuento diferencial de muestras citológicas de médula ósea en fetos de alpaca pertenecientes al último tercio gestacional (F-17 y F-18).....96
- **Apéndice 10.** Mediciones de los diámetros longitudinales y trasversales para cada tipo celular observado en muestras citológicas de médula ósea en fetos de alpaca.....97

- **Apéndice 11.** Estadísticos de la Prueba de Mann-Whitney aplicado a los valores de la relación Mieloide Eritroide del segundo y último tercio de gestación.....98

I. INTRODUCCIÓN

Los Camélidos Sudamericanos, también conocidos como Camélidos del Nuevo Mundo, incluyen a la llama (*Lama glama*) y la alpaca (*Vicugna pacos*) como especies domésticas y al guanaco (*Lama guanicoe*) y la vicuña (*Vicugna vicugna*) como especies silvestres. Estos animales forman parte de la actividad pecuaria en las zonas alto andinas de países como Perú, Argentina, Chile y Bolivia. (Mendoza *et al.*, 2013), Se han realizado numerosos trabajos de investigación sobre estas especies. Si bien los mecanismos de adaptación hematológicos a la altura han sido muy estudiados especialmente en alpacas (Sillau, 1965; Cristofanelli *et al.*, 2005; Braga *et al.*, 2007; Quispe, 2011; Arias *et al.*, 2016), existe escasa información sobre el rol de la médula ósea en la hematopoyesis de estas especies, siendo estudiada principalmente con fines diagnósticos y descriptivos en animales adultos o enfermos (anemia no regenerativa, leucemia mieloide aguda y displasia medular) como lo describe el trabajo de Steinberg *et al.* (2008); y algunos trabajos que determinaron la relación mieloide-eritroide en la médula ósea de alpacas y llamas adultas (Andreasen *et al.*, 1994; Tornquist, 2009). A su vez existen diversos estudios en otros mamíferos, teniendo como principal referencia al ratón, que detallan, el desarrollo y contribución de la médula ósea en la hematopoyesis durante el desarrollo fetal (Coskun *et al.*, 2014); sin embargo al ser la alpaca una especie con adaptaciones hematológicas (morfología y funcionalidad) diferentes a otros mamíferos es insuficiente la información que se tiene para la comprensión real del comportamiento expresado en términos de celularidad y relación mieloide-eritroide en médula ósea durante el desarrollo fetal de estos animales.

El objetivo del presente estudio fue caracterizar citológicamente la médula ósea a través de la evaluación cualitativa (observacional) y cuantitativa (observacional y morfométrica) de las diferentes células precursoras hematopoyéticas durante el desarrollo fetal en la alpaca (*Vicugna pacos*).

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

Los camélidos sudamericanos (CSA) representan un recurso de alto valor económico, social, cultural y científico en las zonas alto andinas de Argentina, Bolivia, Chile, Ecuador y Perú (Sumar, 1991), la importancia de estas especies para la población alto andina radica en la adaptación a zonas geográficas superiores a 4 000 metros sobre el nivel del mar así como el aprovechamiento de los escasos recursos nutricionales que ofrecen los pastos en dichas zonas, en las cuales diferentes especies de similar valor productivo (bovinos y rumiantes menores) no prosperan. (Fernández-Baca, 2005).

Los CSA domésticos: Llama (*Lama glama* Linnaeus, 1758) y Alpaca (*Vicugna Pacos* Linnaeus, 1758) proveen al poblador andino productos y subproductos (Esquivel *et al.*, 2018); la carne es de alto valor nutritivo (alto valor proteico, niveles de aminoácidos similares a rumiantes y bajos niveles de colesterol), pero con bajo rendimiento de carcasa (Mamani-Linares *et al.*, 2014), la fibra es el recurso más valorado en las alpacas, aumentando su calidad y por ende su valor económico en las últimas décadas debido al mejoramiento genético desarrollado por los principales centros de investigación animal en el Perú (Oruna, 2016); además en estas

especies se aprovechan algunos subproductos como las pieles, cueros e incluso el estiércol, como producto combustible para la cocción de los alimentos y como fertilizante orgánico (Pinto *et al.*, 2010). La llama, gracias a su vigor y envergadura, es empleada como animal de carga y posee un rol importante en el transporte en las áreas rurales carentes de vías de comunicación (Fernández Baca, 2005). De las especies silvestres, vicuña (*Vicugna vicugna* Molina, 1782) y guanaco (*Lama guanicoe* Müller, 1776), la más importante es la vicuña que aporta fibra de calidad excepcional siendo su aprovechamiento, regulado legalmente. (Pinto *et al.*, 2010).

La población mundial actual de CSA es de 8 millones aproximadamente, los cuales están distribuidos en su mayoría en los andes desde Ecuador hasta Tierra de fuego en Chile (Sector Agrario, 2011). El mayor número de CSA domésticos se concentra en Bolivia y Perú, con una mayor población de Llamas en Bolivia y de Alpacas en Perú; con respecto a los CSA silvestres, Perú concentra la mayor cantidad de Vicuñas, mientras que Argentina y Chile reúnen la mayor población de Guanacos. (Quispe *et al.*, 2009).

Perú es el principal productor de camélidos sudamericanos del mundo con poco más de 5 millones de cabezas entre las cuatro especies, distribuidas principalmente en las regiones Puno, Cuzco, Arequipa y Huancavelica con 55%, 12%, 10% y 6% respectivamente (Sector Agrario, 2011).

2.1.1. LA ALPACA

La alpaca representa la especie más importante de los CSA domésticos desde el punto de vista productivo, desarrollándose la crianza principalmente bajo un sistema productivo de pequeñas familias llamados “alpaqueros” en las poblaciones alto andinas (Quispe *et al.*, 2009) involucrando de esta manera al 11% de la población nacional peruana representados por aproximadamente 100,000 productores (Brenes *et al.*, 2001).

En la actualidad el Perú es el principal productor de alpacas, albergando más del 85% de la población mundial de esta especie (Portal Agrario, 2009). La población nacional es de 3 596 753 alpacas y la crianza está distribuida principalmente en los departamentos de Puno, Cuzco, Arequipa y Huancavelica (INEI, 2012).

Existen dos variedades de alpaca que son clasificadas de acuerdo a las características de la fibra: Huacaya y Suri. La variedad Huacaya compone alrededor del 88% de la población nacional y se caracteriza por tener una fibra rizada de apariencia esponjosa; mientras que la variedad suri expone una fibra menos rizada de mayor longitud y lustrosa, por estas características la fibra de variedad suri es más cotizada (Ponzoni *et al.*, 1997).

2.1.1.1. Taxonomía

Reino: Animalia

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Superclase: Tetrapoda

Clase: Mammalia

Subclase: Theria

Orden: Artiodactyla

Familia: Camelidae

Género: *Vicugna*

Especie: *Vicugna pacos* (Kadwell *et al.*, 2001; Wheeler, 2006)

2.1.2. PARTICULARIDADES ANATÓMICAS Y FISIOLÓGICAS EN CSA

La exitosa adaptación de los CSA frente a las adversas características propias de su entorno (hipoxia ambiental y disponibilidad de nutrientes) se debe a asombrosas particularidades anatómicas y fisiológicas, adquiridas a lo largo de su evolución (Quispe, 2011).

2.1.2.1. Adaptación a la hipoxia ambiental

Se han realizado numerosos estudios en llamas adultas y en sus fetos obteniendo como resultados que estos animales como parte de los CSA están genéticamente adaptados a la

hipoxia hipobárica de la altura (Giussani *et al.*, 1999; Llanos *et al.*, 2003, 2007; Herrera *et al.*, 2008).

La presión arterial pulmonar (PAP) se ve incrementada moderadamente cuando la mayoría de mamíferos (incluyendo al hombre) son expuestos a condiciones de hipoxia ambiental debido a elevadas altitudes; sin embargo, los CSA en un entorno ambiental con las mismas condiciones solo evidencian un leve aumento de la PAP (Harris *et al.*, 1982; Williams, 1994), esto se debe a las características histológicas vasculares que facilitan el intercambio gaseoso a nivel pulmonar: la capa adventicia de las arterias pulmonares es muy delgada, así como las arteriolas pulmonares poseen solo una lámina elástica con abundante colágeno disperso en el intersticio que conforma la pared vascular (Harris *et al.*, 1982). Además se cree, que un mecanismo de protección durante el periodo neonatal (etapa crítica si los valores de oxígeno ambiental son bajos para otros mamíferos) sería un aumento en la producción de monóxido de carbono pulmonar actuando así como un potente vasodilatador a nivel pulmonar (Herrera *et al.*, 2008).

La adaptación hematológica a la altura en los CSA está estrechamente relacionada con la morfología y función de los eritrocitos, de esta forma los hematíes en CSA poseen un recuento total circulante superior que otros mamíferos, pero el hematocrito es menor, debido a su forma elíptica y reducido tamaño (6.5 x3.3 micrómetros) (Weiser *et al.*, 1992; Fowler y Bravo, 2011), esta forma y tamaño es de gran utilidad en la distribución sistémica de oxígeno, ya que los eritrocitos orientan su eje mayor en dirección al flujo sanguíneo, esto conlleva a una eficiente circulación eritrocitaria en los pequeños capilares (Fowler y Bravo, 2011).

Cuantitativamente los valores de concentración media de hemoglobina corpuscular de los CSA es superior al de otras especies domésticas (Fowler y Bravo, 2011) además la afinidad de oxígeno por la hemoglobina es superior en los CSA, esto se debe a que evolutivamente las condiciones de hipoxia de altura generaron cambios en la estructura de las moléculas de hemoglobina aumentando de esta forma su afinidad por el oxígeno (Weber, 2007). Estos cambios representan sustituciones de aminoácidos en los sitios de unión al fosfato (Bauer *et al.*, 1980; Kleinschmidt *et al.*, 1986; Weber, 2007).

2.1.2.2. Nutrición

Los CSA presentan labio leporino, el cual otorga a estas especies una especial ventaja para aspirar y recolectar forraje con gran eficacia (Raggi *et al.*, 1998) además al igual que los rumiantes regurgitan y vuelven a masticar el forraje que ingieren sin embargo son mucho más eficientes que éstos en la extracción de proteína y energía de los forrajes de pobre calidad (Sponheimer *et al.*, 2003; Durand *et al.*, 2018), esto se debe en gran parte a la anatomía y fisiología del estómago encontrando notorias diferencias con respecto a los rumiantes. El estómago es policavitario; contando con tres compartimentos denominados C1, C2 y C3 que no son análogos al rumen, retículo, omaso y abomaso de los rumiantes (Engelhardt *et al.*, 2007). De esta forma el C1 es el compartimento más grande y está dividido en una porción craneal y otra caudal por un pliegue muscular transversal, continúa el compartimento C2, el cual es el más pequeño. El compartimento C3, cuyo origen se sitúa en el C2, se ubica a la derecha del C1 y posee forma tubular y alargada.

Fisiológicamente los compartimentos C1 y C2 participan en los procesos de fermentación y contienen la microbiota necesaria para el aprovechamiento de los vegetales con alto contenido de celulosa (Valle *et al.*, 2008; Fowler y Bravo, 2011) además sólo la porción final de C3 posee actividad secretoria digestiva (ácido clorhídrico) (Engelhardt *et al.*, 2007).

Estas características anatómicas y fisiológicas exponen que los CSA poseen una excelente eficiencia digestiva con alimentos escasos de nutrientes (pastos naturales estacionales muy toscos, de baja variedad y disponibilidad), eficiencia relacionada con una elevada tasa de contracciones de sus cavidades estomacales y la retención prolongada del alimento en su tracto digestivo sumado a una favorable microbiota celulolítica fermentadora, da como resultado un aprovechamiento superior de pastos toscos y marginales que otros rumiantes como la cabra (Raggi *et al.*, 1998; Sponheimer *et al.*, 2003).

2.1.2.3. Reproducción

Los CSA reproductivamente se caracterizan por tener un relativo largo periodo de gestación (342 a 350 días en llamas y alpacas) en comparación con otras especies productivas y la gestación generalmente de una sola cría (Brown, 2000), asimismo la cópula en llamas y

alpacas dura entre 30 y 50 minutos y la eyaculación es intrauterina (Cebra *et al.*, 2014). A diferencia de los rumiantes las hembras de los CSA no presentan un ciclo estral definido y se muestran receptivas al macho de forma continua a no ser que estén preñadas o hayan parido recientemente, esto conlleva que expongan ovulación inducida post cópula (Fowler y Bravo, 2011). Hace mucho se estudia esta peculiaridad y se creía que al igual que en las demás especies de ovulación inducida (gato, conejo, hurón, zorro), el principal mecanismo responsable de dicha inducción estaba relacionado con una respuesta neuroendocrina a la estimulación física de la vagina y el cérvix por el pene durante la monta (Bakker y Baum, 2000); sin embargo en la actualidad se conoce que la ovulación en los CSA se desencadena a partir de una molécula presente en el plasma seminal: el factor inductor de ovulación (FIO) (Adams *et al.*, 2005), la existencia de esta sustancia fue inicialmente reportada por investigadores chinos, quienes concluyeron que algún factor presente en el semen de los camellos bactrianos (*Camelus ferus bactrianus*) era responsable de iniciar la ovulación, debido a que la administración intravaginal de semen o plasma seminal indujo ovulación en 41 de 47 (87%) de las hembras inseminadas (Chen *et al.*, 1985). El efecto de este factor sobre la inducción de la ovulación parece estar mediado vía sistémica más que local, y la absorción sistémica del factor seminal a partir del útero en alpacas se vería favorecida por la eyaculación intrauterina y las erosiones del endometrio que se produce durante la prolongada cópula (Ratto *et al.*, 2006). Adicionalmente, nuevas evidencias documentan que este factor no solamente está presente en el plasma seminal de llamas y alpacas sino que podría ser una molécula conservada en especies de ovulación espontánea como el bovino, equino y porcino (Ratto *et al.*, 2006; Orleigh, 2009). La placentación de las alpacas y llamas se describe como epiteliocorial y difusa (Fowler y Olander, 1990; Olivera *et al.*, 2003).

2.1.3.- GESTACIÓN Y DESARROLLO FETAL EN LA ALPACA

2.1.3.1. Duración de la gestación

El periodo medio de gestación en la alpaca es variable y esto depende de la latitud, estado nutricional, estación del año, variedad: Suri y Huacaya (Drew *et al.*, 1995; Davis *et al.*, 1997). En Perú a 4300 metros sobre el nivel del mar, en el departamento de cuzco, San Martín *et al.* (1968) reportó un promedio de $341,6 \pm 0,1$ días (en 169 hembras) para la variedad Huacaya y un promedio de $345,3 \pm 0,4$ días (en 137 hembras) para la variedad Suri. En Nueva Zelanda, 60 alpacas apareadas en primavera tuvieron un promedio de $348,9 \pm 1,4$ días, mientras que 102 hembras apareadas en otoño promediaron $336,4 \pm 1,2$ días de gestación (Davis *et al.*, 1997) La duración gestacional influenciada por las variaciones estacionales también se ha descrito en Australia, con gestaciones más largas en hembras que concibieron en primavera ($351,0 \pm 4,1$), seguido de verano ($346,7 \pm 2,1$), Otoño ($336,9 \pm 4,3$) e invierno ($330,6 \pm 2,8$) (Vaughan y Tibary, 2006).

Se ha reportado que ni el número de partos de la hembra, ni el sexo del neonato influye en la duración de la gestación en Camélidos sudamericanos (Davis *et al.*, 1997)

2.1.3.2. Reconocimiento maternal de la gestación

Se presume que las señales embrionarias para el reconocimiento maternal de la preñez en alpacas deben transmitirse antes del día 10 después de la monta para mantener el cuerpo lúteo gestacional, esto debido a varias proteínas producidas por el embrión temprano que contrarrestan el efecto luteolítico de la Prostaglandina $F_{2\alpha}$ (Aba *et al.*, 1997).

Algunos estudios en dromedarios evidencian que embriones de 10 días exhiben alta actividad endocrina y sintetizan grandes cantidades de estrona y estradiol. Esta actividad coincide con el tiempo de la luteólisis y puede ser la primera señal para el reconocimiento materno y la prevención de la luteólisis (Skidmore *et al.*, 1996) También han sido reportados altos niveles de sulfato de estrona entre los días 21 y 27 de gestación en alpacas (Bravo *et al.*, 1996).

2.1.3.3. Desarrollo embrionario y fetal

El 98% de las gestaciones de alpacas ocurren en el cuerno uterino izquierdo, aunque el cuerpo lúteo se encuentre indistintamente en el ovario izquierdo o derecho (Fernandez-Baca *et al.*, 1973; Bravo y Varela, 1993).

A los cuatro días post-cópula puede encontrarse en el oviducto una mórula de cuatro a ocho células (Bravo *et al.*, 1996). El embrión entra en la cavidad uterina aproximadamente a los cinco a seis días después de la ovulación al momento de la eclosión o al inicio de la etapa de blastocisto eclosionado (McKinnon y Tinson, 1992; Tibary, 2001). El embrión comienza a alargarse por nueve a diez días y el trofoblasto establece contacto cercano con el endometrio al día 12 de gestación (Tibary, 2001).

La implantación endometrial se evidencia alrededor del día 14 post ovulación como se describe en otros camélidos (Olivera *et al.*, 2003). Las interacciones definitivas entre las membranas del epitelio uterino y las células trofoblásticas son observadas exclusivamente en el cuerno izquierdo en zonas alrededor del embrión conocidas como almohadillas ectoplásmicas, las cuales se cree que funcionan como puntos iniciales de intercambio metabólico y reconocimiento materno-fetal. (Skidmore *et al.*, 1996). Las superficies de contacto del trofoblasto y las células epiteliales uterinas muestran una capa ricamente glicosilada que puede jugar un papel en el proceso de implantación (Jones *et al.*, 2000, 2002). La placentación puede ser observada a través de ultrasonido a partir del día 45 post cópula (Olivera *et al.*, 2003).

La interacción aumenta en profundidad y complejidad junto con la edad gestacional para maximizar el intercambio de oxígeno a través del incremento del contacto superficial entre los vasos maternos y embrionarios de esta forma ambos lados de la estructura placentaria muestran un aumento de la expansión capilar que sugiere una mayor demanda de oxígeno durante todas las etapas de la gestación. (Fowler y Olander, 1990; Olivera *et al.*, 2003).

Mendoza (2012) clasificó en tercios o periodos el desarrollo fetal, considerando que el primer tercio es hasta los 110 días de gestación, el segundo hasta los 220 días de gestación y el tercero mayor a los 220 días de gestación.

Melle (2011) estudió el desarrollo fetal en cinco hembras alpaca usando ecografía transrectal para describir el desarrollo estructural de los fetos obteniendo como resultados que la primera evidencia de cefalización se dio entre los días 47 y 71; la osificación fue observada a partir de los días 70 a 78; la osificación de las vértebras cervicales se evidenciaron entre los días 70 y 80; finalmente la primera evidencia del estómago a los 39 días y a los 103 días se pudo diferenciar los tres compartimentos estomacales.

En el último tercio, el feto se encuentra completamente cubierto por una membrana epidérmica adherida a los labios, nariz, ojos, ano, vulva / prepucio por una conjunción mucocutánea (Fowler y Olander, 1990). Debido a que los fluidos fetales son bajos en volumen en esta etapa, se cree que esta membrana contribuye a la lubricación de los fetos durante el proceso de parto (Vaughan y Tibary, 2006).

2.2. HEMATOPOYESIS EMBRIONARIA Y FETAL

La complejidad del sistema hematopoyético ha sido altamente conservada a través de la evolución de las especies vertebradas. Entender los orígenes de la hematopoyesis embrionaria y fetal provee importantes ideas con respecto a la función del sistema hematopoyético adulto (Baron, 2003).

Los avances técnicos recientes han permitido a los investigadores caracterizar las relaciones espaciales y temporales, así como los mecanismos celulares y moleculares del desarrollo hematopoyético; estos avances realizados usan al ratón (*Mus musculus*), especie que tiene un tiempo de gestación de 20 días, como modelo para investigar la ontogenia hematopoyética, y por ende los órganos implicados como la médula ósea (Coskun *et al.*, 2010).

Los procesos que impulsan la etapa primitiva y definitiva de la hematopoyesis, así como los eventos que regulan la transición entre las dos etapas, están mediados por una variedad de factores (Medvisnky y Dzierzak, 1998; Speck *et al.*, 2002; Baron, 2003; Teitell *et al.*, 2006).

Los factores de adhesión celular, factores de crecimiento y factores de transcripción involucrados en este proceso a menudo apoyan la diferenciación de múltiples tipos de células hematopoyéticas

(Everds, 2007), y la dependencia de un linaje celular dado en cualquier molécula particular puede diferir entre hematopoyesis primitiva y definitiva (Mckercher *et al.*, 1996).

2.2.1. HEMATOPOYESIS EMBRIONARIA

La hematopoyesis se produce en múltiples sitios dentro del embrión y en tejidos extraembrionarios. La primera fase de la producción de células sanguíneas, denominada hematopoyesis primitiva, es responsable de producir elementos sanguíneos durante la etapa más temprana de la embriogénesis (Medvisnky y Dzierzak, 1998).

2.2.1.1. Saco vitelino

La hematopoyesis primitiva tiene lugar en el saco vitelino visceral a partir de aproximadamente el día siete de gestación (E7.0) usando como modelo al ratón (Haar y Ackerman, 1971; Palis *et al.*, 1999).

La formación de células primitivas disminuye rápidamente después del día E11. El saco vitelino visceral o esplacnopleura extraembrionaria (término empleado para una estructura en la que el mesodermo y el endodermo se unen directamente) surge de la migración del mesodermo extraembrionario que fluye desde la veta primitiva caudal a lo largo de la superficie interna del endodermo visceral (Haar y Ackerman, 1971).

2.2.1.2. Hemangioblastos

Las células mesodérmicas comprometidas para iniciar y apoyar la hematopoyesis se han denominado hemangioblastos debido a la contigüidad de la hematopoyesis primitiva y la vasculogénesis, tanto en el espacio como en el tiempo, sugieren que las células hematopoyéticas primitivas y endoteliales en el saco vitelino comparten un ancestro común (Choi, 2002; Baron, 2003).

Los hemangioblastos surgen como células no diferenciadas en la etapa de división primitiva y están comprometidos a la producción de un linaje celular particular antes de la formación de islas sanguíneas (diferentes a las islas rubriblásticas presentes en la médula ósea) (Palis *et al.*, 1999).

Entre el día E7.5 y E9.0, los hemangioblastos forman múltiples agregados denominados islas sanguíneas (Palis y Yoder, 2001). Cada isla sanguínea contiene un núcleo central de hemangioblastos internos no unidos (progenitores hematopoyéticos) rodeados por un borde de hemangioblastos externos en forma de huso (progenitores endoteliales) (Haar y Ackerman, 1971). Las células eritroides nucleadas se reconocen por primera vez en los núcleos de las islas sanguíneas en el día E8.0 y son evidentes en la circulación del sistema cardiovascular a partir del día E8.25 (Ji *et al.*, 2003).

2.2.1.3. Eritroblastos primitivos

En esta etapa, los eritroblastos embrionarios ingresan a la circulación, donde continúan dividiéndose hasta aproximadamente el día E13.0 (Palis y Yoder, 2001).

La mayoría de las células producidas durante la hematopoyesis primitiva son del linaje eritroide. Las células formadoras de colonias eritroides comprometidas llegan al saco vitelino a aproximadamente en el día E7.25. Estas células se expanden hasta el día E8.0 y luego se diferencian en eritroblastos primitivos; todas las células formadoras de colonias regresionan completamente aproximadamente el día E9.0 (Palis *et al.*, 1999) que corresponde aproximadamente a la fase más temprana de la eritropoyesis definitiva. Los eritroblastos primitivos sirven como la única fuente de glóbulos rojos en el embrión temprano desde el día E8.0 hasta aproximadamente el día E10.5 (Palis *et al.*, 1999) y sigue siendo una fuente importante de glóbulos rojos hasta el día E13.

2.2.1.4. Linajes no eritroides

Otros linajes de células hematopoyéticas también se generan en el saco vitelino durante la etapa primitiva del desarrollo hematopoyético. Los precursores linfoides primitivos e incluso algunas células madre adultas evolucionan a partir del día E7.5 y posteriormente se implantan en otros sitios de hematopoyesis, incluida la región aorta-gonada-mesonefros (AGM), los vasos umbilicales y el hígado (Samokhvalov *et al.*, 2007). Palis *et al.* (1999) identificaron macrófagos primitivos en el saco vitelino desde el día E8.0 al E9.0.

Los experimentos *in vitro* han demostrado que las células del saco vitelino en el día E7.5 pueden dar lugar a precursores megacariocíticos funcionales en el día E10.5 (Tober *et al.*, 2007). Muchos hemangioblastos en realidad sirven como progenitores de más de una línea celular, incluidos aquellos capaces de comprometerse con líneas mieloides/eritroides (Bertrand *et al.*, 2005b) y eritroides / megacariocíticos (Mcgrath y Palis, 2008), Mieloides / macrofagocíticos y linajes linfoides (células B y células T) / mieloides (Kawamoto *et al.*, 1997; Palis *et al.*, 1999). Además las células madre mastocíticas también surgen en el saco vitelino durante la hematopoyesis primitiva (Palis *et al.*, 1999).

2.2.2. HEMATOPOYESIS FETAL

La segunda etapa de la producción de células sanguíneas, denominada hematopoyesis definitiva, surge en la etapa embrionaria principalmente de la región aorta-gónada-mesonefros (AGM) (Bertrand *et al.*, 2005a; Mcgrath y Palis, 2008).

Los progenitores hematopoyéticos comprometidos necesarios para fomentar todas las líneas celulares observadas en animales adultos surgen durante la hematopoyesis definitiva, de esta forma las CMH derivadas de la AGM contribuyen a todos los principales linajes de células hematopoyéticas. La población de CMH de la placenta, apoya a la génesis de líneas eritroides, linfoides (linajes de células B y células T) y elementos mieloides (Samokhvalov *et al.*, 2007).

2.2.2.1. Región aorta-gónada-mesonefros (AGM)

La región AGM es una banda amorfa de localización intraembrionica que abarca la pared dorsomedial de la cavidad abdominal (Medvinsky y Dzierzak, 1996).

2.2.2.2. Células madre hematopoyéticas (CMH)

El inicio de la hematopoyesis definitiva varía entre el día E8.5 y E9.25, y las células madre hematopoyéticas (CMH) definitivas son evidentes en la AGM a más tardar en el día E10. La producción máxima de CMH en la AGM se produce entre E10.5 y E11.5, momento en el que comprenden casi el 10% de todas las células presentes en la región AGM (Medvinsky y Dzierzak, 1998).

Independientemente de su sitio original de síntesis, las CMH migran a otros lugares que soportan una hematopoyesis definitiva: hígado, seguido de timo, bazo fetal y médula ósea (en ese orden). Estos últimos destinos no producen CMH, sino que contienen nichos adecuados para la expansión de las CMH recién llegadas. (Oostendorp *et al.*, 2002).

2.2.2.3. Hígado

El hígado embrionario se coloniza primero, aparentemente porque comparte muchas similitudes moleculares y funcionales con el saco vitelino (Medvinsky y Dzierzak, 1998), proporcionando de esta forma el lugar principal para la hematopoyesis definitiva en la etapa fetal, en el día E12 a E16 de la gestación en el ratón (Rugh, 1990). Las CMH ingresan al hígado en varias ondas sucesivas entre el día E9.0, E10.0 y E12 (Everds, 2007). Las primeras CMH que ingresan al hígado son pluripotentes y pueden formar cualquier tipo de célula hematopoyética, su primer paso en la maduración intrahepática es comprometerse con un rango limitado de líneas celulares, por lo general como un progenitor eritromieloide o un progenitor mielolinfoide común (Kawamoto *et al.*, 2000).

Los precursores eritroides definitivos maduran y se enuclean dentro de los agrupamientos celulares eritrocíticos en el hígado antes de ingresar a la circulación (Mcgrath y Palis, 2008). De

esta manera la mayoría de los estudios realizados por microscopía óptica y electrónica han mostrado un desarrollo temprano de eritropoyesis en "nichos" de hepatocitos, con una maduración continua dentro de los sinusoides hasta el final de la gestación (Everds, 2007).

2.2.2.4. Timo y bazo

El timo y el bazo fetal se colonizan a partir del hígado o la región AGM, o ambos, comenzando alrededor del día E13 para el timo y E15 para el bazo (Oostendorp *et al.*, 2002). Por lo general, el timo solo acepta aquellas CMH que se comprometen a producir células T, mientras que otros elementos mielolinfoides multipotentes se dirigen a otros tejidos (Kawamoto *et al.*, 1999). La mayoría de los tipos de células hematopoyéticas definitivas en el bazo surgen de células precursoras que se comprometen a un linaje específico antes de abandonar el hígado. Las CMH multipotentes que entran en el bazo dejan de proliferar y se diferencian en macrófagos maduros, además estas células pueden regular la eritropoyesis intraesplénica (Wolber *et al.*, 2002).

2.2.2.5. Médula ósea y etapa postnatal

La médula ósea se desarrolla en la mayoría de mamíferos durante el segundo trimestre, mientras que en ratones (especie más estudiada) la médula ósea recibe las CMH a partir de los depósitos hepáticos aproximadamente en el día E16 (Rugh, 1990; Speck *et al.*, 2002). Posteriormente, la asignación de precursores hematopoyéticos formadores de colonias cambia desde una localización principalmente hepatocéntrica en el día E18 a través de una distribución más dispersa (médula ósea, hígado y bazo en proporciones aproximadamente iguales) en el día dos post parto (P2) los precursores hematopoyéticos en los neonatos se distribuyen en una proporción que favorece a la médula ósea y en el día P4 la médula ósea y el bazo cumplen la principal función hematopoyética (Wolber *et al.*, 2002).

2.3. MÉDULA ÓSEA

La médula ósea es el principal órgano hematopoyético en adultos y además un órgano linfóide primario. La médula ósea es un órgano difuso que constituye aproximadamente el 3% de la masa

corporal en ratas, el 2% en perros y el 5% en humanos (Travlos, 2006). El tejido de la médula ósea está presente en las cavidades centrales de los huesos axiales y largos, además está conformado por: un sistema sinusoidal, células hematopoyéticas, tejido adiposo, células reticulares de soporte y matriz extracelular (Wilson y Trumpp, 2006).

La vasculatura compleja y la rica innervación de la médula reflejan la multiplicidad de señales que contribuyen al control de la hematopoyesis, esto hace de la médula ósea un órgano dinámico con capacidad de remodelación estructural y funcional en respuesta a factores nutricionales, señales endocrinas y variaciones en la demanda de la producción de eritrocitos, leucocitos y plaquetas (Fischer-Posovszky *et al.*, 2007; Grindem *et al.*, 2002).

2.3.1. ESTRUCTURA DE SOPORTE

El tejido hematopoyético reside dentro de una corteza ósea rígida, y además está apoyado por una malla ósea trabecular que sirve como un andamio parcial para componentes estructurales adicionales, como el tejido adiposo, las células reticulares y la matriz extracelular. Además de proporcionar soporte físico, cada una de estas estructuras contribuye al microambiente bioquímico del tejido hematopoyético, ya sea directamente o por medio de conexiones vasculares (Travlos, 2006).

2.3.1.1. Matriz extracelular

Las células estromales de la médula ósea producen fibrillas estructurales como colágeno, reticulina, laminina y fibronectina, además una sustancia fundamental compuesta de agua, sales, glicosaminoglicanos y glucoproteínas, que en conjunto se denominan matriz extracelular (Kuter *et al.*, 2007).

2.3.1.2. Osteoblastos y osteoclastos

Una capa gruesa de una a dos filas de células endóseas planas con una capa delgada de tejido conectivo recubre todas las superficies óseas dentro de la cavidad medular. Esta capa

contiene osteoblastos y osteoclastos, y puede ser atravesada por vasos sanguíneos endósticos que conectan el espacio hematopoyético con el hueso (Porter y Calvi, 2008).

Los osteoblastos contribuyen a la producción ósea y se derivan de células progenitoras estromales mesenquimales multipotentes que también dan lugar a células estromales de la médula ósea y adipocitos (Lorenzo *et al.*, 2008).

Los osteoclastos son células multinucleadas derivadas de precursores de macrófagos y monocitos fusionados bajo la influencia de numerosas señales, incluidas las de los osteoblastos (Lorenzo *et al.*, 2008).

Los osteoblastos y los osteoclastos también producen citoquinas hematopoyéticas, y la interacción entre el hueso y las células hematopoyéticas influyen en la renovación y remodelación ósea (Porter y Calvi, 2008).

2.3.1.3. Tejido adiposo

El tejido adiposo intercalado con el tejido hematopoyético se interconectan en las mismas estructuras de soporte; las células principales de este tejido: los adipocitos, probablemente se derivan de los mismos progenitores mesenquimatosos que producen células estromales y osteoblastos, y existe evidencia de interconversión de células originadas en linajes comunes de osteoblastos y de tejido adiposo derivados de líneas progénitoras mesenquimáticas (Anjos-Afonso y Bonnet, 2007).

Los adipocitos son las células estromales más numerosas en la médula ósea: en animales sanos, el tejido adiposo ocupa aproximadamente del 25% al 75% del espacio de la médula ósea, dependiendo de la edad del animal (Corre *et al.*, 2006). Además de proporcionar soporte estructural, el tejido adiposo también puede participar en el micro entorno hematopoyético. Las células derivadas del tejido adiposo de la médula ósea son capaces de soportar la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos *in vitro* (Dimascio *et al.*, 2007).

Las funciones endocrinas y paracrinas del tejido adiposo también son importantes (Fischer-Posovszky *et al.*, 2007; Sethi y Vidal-Puig, 2007), es así como las adipoquinas, que son sustancias biológicamente activas producidas por el tejido adiposo, incluyen reguladores de la hematopoyesis y la respuesta inmune (Dimascio *et al.*, 2007; Kilroy *et al.*, 2007; Lago *et al.*, 2007; Lam y Lu, 2007; Payne *et al.*, 2007).

2.3.1.4. Arquitectura sinusal

La hematopoyesis se produce en los espacios extravasculares entre los senos venosos, y tiene una relación morfológica y funcional estrecha con las células que recubren los senos venosos (Lichtman, 1981).

La lámina basal entre los sinusoides y el espacio hematopoyético es delgada e interrumpida para facilitar la liberación de células hematopoyéticas maduras a la circulación. Las células endoteliales de los senos venosos pueden regular la translocación de las células y otras sustancias a la circulación sistémica (Lichtman, 1981).

2.3.2. VASCULATURA

La arteria nutricia proporciona el principal suministro de sangre a la médula ósea. Esta arteria entra en la cavidad medular a través de uno o más canales, que también pueden estar acompañados por una o dos venas. A menudo hay dos arterias nutricias en los huesos largos, y los huesos planos pueden contener varias de estas (Travlos, 2006). Una vez que los vasos han penetrado en la corteza, las ramas ascendentes y descendentes se bifurcan desde los vasos principales, enrollándose alrededor del canal principal de la médula ósea venosa y la vena longitudinal central (Naito *et al.*, 1992). Estas ramas forman numerosas arteriolas y capilares que penetran en la superficie endosteal del hueso para comunicarse con los capilares corticales derivados de las arterias que suministran el tejido muscular circundante. Estas interacciones facilitan la comunicación y la regulación recíproca entre las células hematopoyéticas y el hueso (Lorenzo *et*

al., 2008). Los capilares derivados de la arteria nutriente se extienden hasta los canales de Havers antes de regresar a la médula ósea y abrirse a los senos venosos (Naito *et al.*, 1992).

2.3.3. INERVACIÓN

La inervación primaria de la médula ósea es a través de fibras mielinizadas y no mielinizadas (más numerosas). Estas fibras se originan en el nervio espinal correspondiente a la ubicación del foramen nutricio, aunque alguna inervación puede originarse a partir de los agujeros epifisarios y metafisarios (Calvo, 1968; Travlos, 2006). Una vez dentro de la cavidad medular, los haces de nervios mixtos, mielinizados y no mielinizados, rodeados por un perineuro delgado, se dividen en paralelo a la vasculatura arterial de la médula ósea (Calvo, 1968).

La médula ósea contiene fibras nerviosas sensoriales simpáticas y eferentes noradrenérgicas y peptidérgicas (Dénes *et al.*, 2005; Nance y Sanders, 2007). Existe alguna evidencia de que las señales del sistema nervioso simpático pueden contribuir a la regulación de la hematopoyesis, la función inmune y el tráfico de células madre hematopoyéticas (Dénes *et al.*, 2005).

2.3.4. ORGANIZACIÓN CELULAR

Diferentes linajes celulares ocupan lugares específicos: los granulocitos, los linfocitos y los macrófagos se concentran cerca del endostio y las arteriolas, y los megacariocitos y las células eritroides se localizan cerca de los senos venosos (Naito *et al.*, 1992; Gasper, 2000).

Las células hematopoyéticas se derivan de una célula madre pluipotencial común que da lugar a células progenitoras linfoides y mieloides (Figura 1) (Gasper, 2000). Las células progenitoras linfoides generan progenie de linfocitos, mientras que las células progenitoras mieloides generan células eritroides, megacariocitos, basófilos, eosinófilos, neutrófilos y macrófagos. Cada línea celular muestra una progresión piramidal del número de células con las células menos maduras presentes en los números más pequeños y las células en etapas posteriores de desarrollo presentes en proporciones crecientes. (Brockus, 2011).

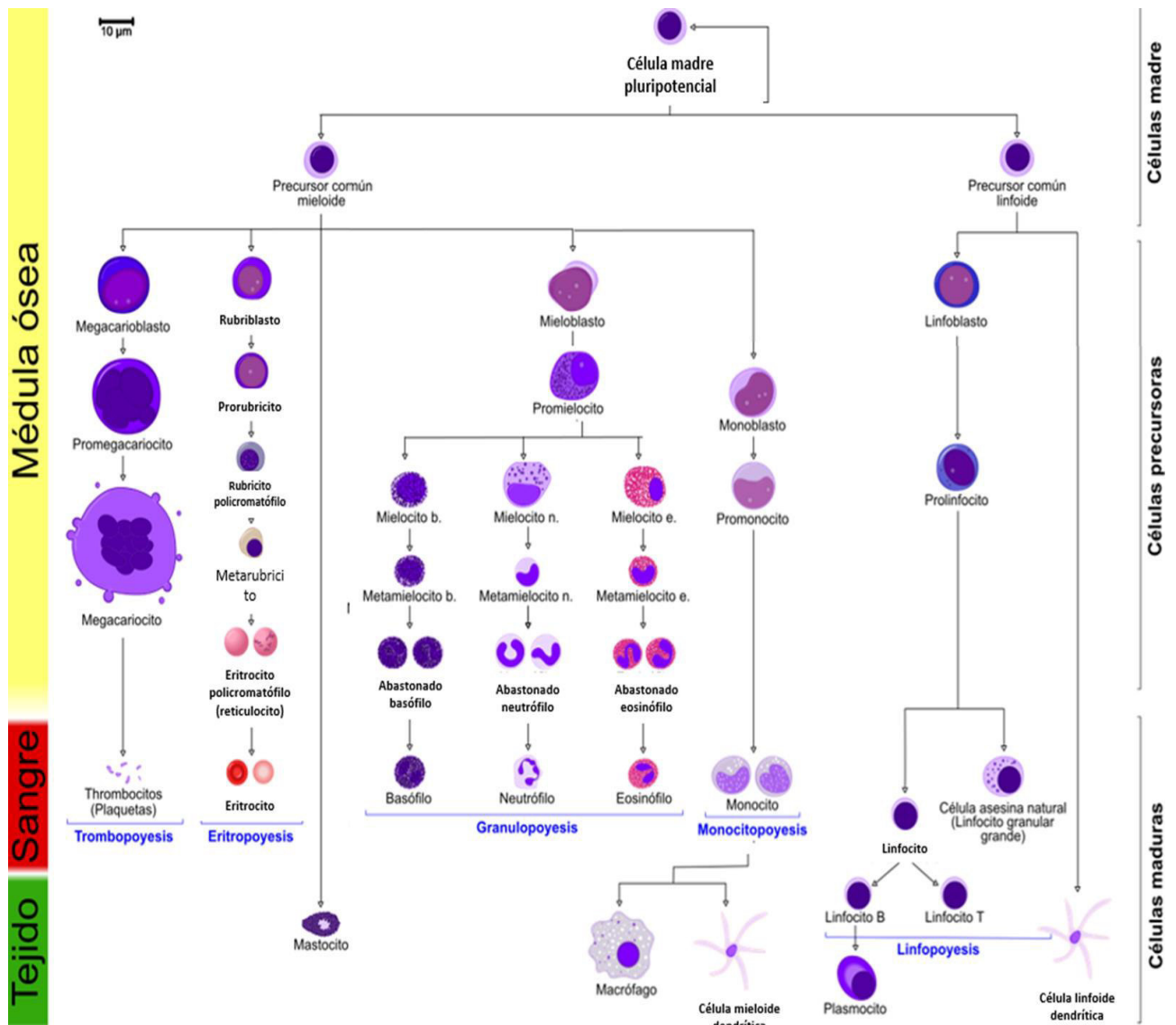


Figura 1. Representación de la hematopoyesis a partir de una célula madre hematopoyética pluripotencial dando origen a diferentes líneas celulares sanguíneas. Adaptado de Brockus, 2011.

2.3.4.1. Megacariocitos

El desarrollo de megacariocitos comienza con el megacarioblasto, progresa a promegacariocitos y megacariocitos basófilos, y culmina con la formación de megacariocitos maduros. Los precursores de megacariocitos aumentan progresivamente a medida que se diferencian para convertirse en la célula más grande de la médula ósea (60 a 100 micrómetros) (Battinelli *et al.*, 2007; Grindhem *et al.*, 2008), el núcleo madura hasta un gran núcleo

multilobulado a través de un proceso denominado endomitosis, que es la replicación del ADN sin división celular (Battinelli *et al.*, 2007). El citoplasma de los primeros precursores megacariocíticos es escaso y profundamente basófilo, se vuelve más abundante, ligeramente basófilo y está lleno de numerosos gránulos eosinófilos a medida que la célula madura (Grindem *et al.*, 2002). A medida que los megacariocitos maduran, migran hacia los senos venosos y pueden formar parte de la capa de células endoteliales. (Abboud y Litchman, 2006; Fry y McGavin, 2007), esta ubicación permite que los procesos citoplasmáticos se extiendan a través de las uniones endoteliales (gaps) y se descarguen agregados proplaquetarios directamente en el lumen de los senos venosos. Las plaquetas se liberan a partir de los agregados proplaquetarios a la circulación periférica (Travlos, 2006).

2.3.4.2. Células eritroides

2.3.4.2.1. Islas eritroides

La eritropoyesis ocurre en distintas islas eritroides (Figura 2), que son grupos de células que ocasionalmente se pueden observar en muestras citológicas de médula ósea (Abboud y Litchman, 2006; Chasis y Mohandas, 2008). Las islas eritroides se forman alrededor de un macrófago central que proyecta procesos membranosos para ayudar a la eritropoyesis a proporcionar hierro y probablemente otros nutrientes como citoquinas hematopoyéticas. Estos macrófagos también fagocitan núcleos extruidos y células defectuosas. (Fry y McGavin, 2007; Chasis y Mohandas, 2008).

La progenie eritroide se encuentra en círculos concéntricos que rodean el macrófago central y las formas más jóvenes están más cerca del macrófago (Abboud y Litchman, 2006). Los macrófagos centrales se reclutan a partir de un subconjunto de macrófagos residentes derivados de precursores de monocitos (Yokohama *et al.*, 2003).

Las islas eritroides se encuentran localizadas cerca de los senos venosos (Abboud y Litchman, 2006; Chasis y Mohandas, 2008). De esta forma Yokohama *et al.*, 2003 sugiere que las islas eritroides son móviles y migran hacia los sinusoides a medida que maduran, mientras que Chasis y Mohandas, 2008 postulan que las islas eritroides están compuestas de células en etapas de similar desarrollo.

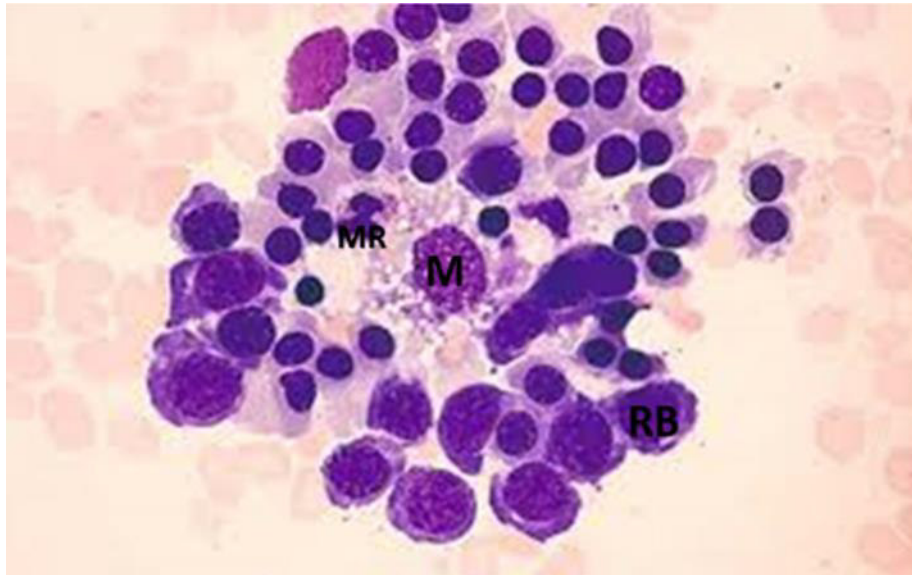


Figura 2. Isla eritroide a partir de un aspirado citológico de médula ósea; se observa un macrófago central (M) cerca a este se observan células eritroides maduras: Metarrubricito (MR) e inmaduras: Rubriblasto (RB). (Chasis y Mohandas, 2008)

2.3.4.2.2. Eritropoyesis

Las etapas de la eritropoyesis incluyen rubriblastos (denominado también rubroblasto), prorubricitos, rubricitos, metarubricitos, reticulocitos y hematíes maduros (Fry y McGavin, 2007; Brockus, 2011).

A medida que los precursores eritroides maduran, las células se vuelven más pequeñas, la relación núcleo a citoplasma disminuye, el citoplasma se vuelve menos basófilo y más policromatófilo, y la cromatina nuclear se condensa, además en los mamíferos, el núcleo se extruye en la etapa final de maduración. (Abboud y Litchman, 2006).

- **Rubroblasto**

El primer precursor es denominado rubroblasto. Mide de 14 a 19 micrómetros, es una célula grande con citoplasma profundamente basófilo; un núcleo redondo, centralmente localizado; cromatina nuclear finamente granular pero profundamente teñida; y uno o más nucléolos prominentes. El citoplasma profundamente basófilo ayuda a distinguir el eritroide temprano de los precursores mieloides tempranos. Los rubroblastos se someten

a una serie de pasos de diferenciación que resultan en una disminución progresiva del tamaño celular, un aumento gradual en la concentración de hemoglobina citoplásmica y una condensación gradual de la cromatina nuclear (Grindem *et al.*, 2002).

- **Prorubricito**

El prorubricito es similar al rubriblasto pero de menor tamaño (12 a 15 micrómetros), además puede tener uno o ningún nucléolo y posee cromatina más condensada (Brockus, 2011).

- **Rubricito Basófilo**

Los rubricitos basófilos (8 a 12 micrómetros), no poseen nucléolos y tienen la concentración de hemoglobina más baja y, por lo tanto, todavía tienen un citoplasma profundamente basófilo. A medida que sigue la maduración en los siguientes estadios celulares la concentración de hemoglobina citoplasmática va en aumento, lo que afecta la calidad de tinción del citoplasma (Yokohama *et al.*, 2003).

- **Rubricito Policromatófilo**

Los rubricitos policromatófilos (8 a 10 micrómetros) se diferencian de los rubricitos basófilos por tener un citoplasma que varía de azul gris a gris, según la concentración de hemoglobina, además la cromatina nuclear se encuentra más condensada (Brockus, 2011).

- **Metarubricito**

Los metarubricitos (5 a 10 micrómetros) son los que tienen más hemoglobina y por lo tanto, tienen citoplasma de gris a rojizo. Los metarubricitos también tienen cromatina nuclear densa, compacta y homogénea. En este punto, el núcleo se extruye para producir glóbulos rojos policromatófilos, que se tiñen como reticulocitos con tintes vitales como el azul de metileno nuevo. Todos los precursores, excepto los metarubricitos, son capaces de dividirse (Brockus, 2011).

2.3.4.3. Leucocitos

La ubicación de las células leucocíticas depende de su etapa de madurez. Las formas inmaduras se localizan cerca de arteriolas y trabéculas óseas. A medida que avanza la maduración, los precursores migran hacia las sinusoides venosas, donde acceden a la circulación periférica mediante diapédesis (Abboud y Litchman, 2006; Fry y McGavin, 2007).

2.2.4.3.1.-Leucopoyesis

Los precursores de neutrófilos, eosinófilos y basófilos comprometidos se someten a una secuencia de maduración similar. Estos precursores leucíticos al igual que los eritroides, disminuyen su tamaño celular y su relación núcleo-citoplasma a medida que maduran (Naito *et al.*, 1992).

Los gránulos específicos aparecen en el estadio de los mielocitos y permiten la diferenciación de los distintos linajes leucocíticos. En el estadio de metamielocitos, el núcleo redondo se alarga y hace muescas para formar un núcleo en forma de frijol antes de formar segmentaciones en la maduración completa. (Grindhem *et al.*, 2008).

- **Mieloblasto**

El mieloblasto (15 a 20 micrómetros) es la primera célula del linaje leucocítico que es reconocible por microscopía de luz. Para cada mieloblasto, existe el potencial de producir 16 - 32 células. El mieloblasto se caracteriza por su cromatina finamente punteada, por su relación núcleo citoplasma alta y por contener uno a múltiples nucléolos, su citoplasma es moderadamente basófilo. Inicialmente, el citoplasma carece de gránulos, pero pequeñas cantidades de gránulos primarios o azurófilos comienzan a aparecer a medida que el mieloblasto madura (Abboud y Litchman, 2006).

- **Promielocito**

El promielocito o progranulocito suele ser más grande que el mieloblasto (puede exceder los 20 micrómetros) y se caracteriza por un aumento en el número de gránulos primarios conteniendo esterasa, lisosima, serprocidinas, defensinas, proteína aumentadora de la permeabilidad bacteriana y mieloperoxidasa y una disminución de la basofilia citoplásmica. El aparato de Golgi puede ser visible y está libre de gránulos. El patrón de la cromatina permanece finamente punteado y los nucléolos pueden o no estar presentes. A medida que los promielocitos maduran, los gránulos primarios se hacen menos evidentes por microscopía óptica y aparecen gránulos secundarios (Fry y McGavin, 2007).

- **Mielocito**

El mielocito es más pequeño que el promielocito (12 a 15 micrómetros) y se caracteriza por un núcleo redondo a ligeramente ovalado con cromatina parcialmente condensada y citoplasma ligeramente basófilo que contiene gránulos secundarios (Abboud y Litchman, 2006). El mielocito es la etapa en la que el compromiso con una línea granulocítica específica se puede discernir más fácilmente mediante microscopía de luz debido a la presencia de gránulos secundarios específicos de linaje (Grindem *et al.*, 2002). El mielocito se considera la última etapa en la que se produce división celular.

- **Metamielocito y abastonado**

Los metamielocitos (8 a 12 micrómetros) y los granulocitos de banda o abastonados (8 a 12 micrómetros) ya no son capaces de efectuar división celular, pero experimentan una maduración nuclear caracterizada por el aumento de la condensación de la cromatina y la segmentación progresiva del núcleo. El metamielocito tiene un núcleo alargado en forma de frijol, mientras que los abastonados tienen un núcleo en forma de U o S con lados lisos y paralelos. A medida que estas células maduran desde el metamielocito hasta los abastonados, el citoplasma se vuelve menos basófilo y el contenido de gránulos madura (Fry y McGavin, 2007).

- **Segmentado**

Los leucocitos segmentados (6 a 12 micrómetros) tienen cromatina condensada y un núcleo segmentado con múltiples lóbulos separados por áreas similares a cadenas finas. El grado de segmentación varía con el tipo de leucocito y las especies. En general, los neutrófilos segmentados tienen tres a cinco lóbulos, mientras que los eosinófilos pueden ser bilobulados. Los núcleos basófilos maduros pueden aparecer monocitoides a bilobulados (Grindhem *et al.*, 2008).

2.2.4.4.- Células linfoides y macrófagos

Los progenitores linfoides producen células B, que se desarrollan más en la médula ósea, y los progenitores T / NK, que dejan la médula ósea para un mayor desarrollo en el timo y otros tejidos. Las células linfoides inmaduras y los macrófagos se localizan cerca del endostio y las arteriolas (Hermans *et al.*, 1989; Naito *et al.*, 1992; Abboud y Litchman, 2006) mientras que los linfocitos maduros se distribuyen de manera relativamente uniforme con el parénquima de la médula ósea. Los cambios morfológicos en las células linfoides durante la maduración son relativamente mínimos en comparación con otros linajes e incluyen disminución del tamaño celular, disminución de la basofilia citoplasmática y aumento de la condensación de la cromatina nuclear (Hermans *et al.*, 1989; Naito *et al.*, 1992; Abboud y Litchman, 2006).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR Y ÉPOCA DE ESTUDIO

La obtención de muestras (fetos) para el presente estudio se realizó en el matadero Municipal de Ninacaca (Figura 3), debido a la factibilidad en la adquisición de las muestras, siendo el único camal de camélidos de la región, ubicado en el Distrito de Ninacaca a 4140 metros sobre el nivel del mar, en el departamento peruano de Cerro de Pasco; durante los meses de Febrero y Marzo del año 2017.

El procesamiento citológico de las muestras (fijación y tinción) se realizó en el Laboratorio de Patología Clínica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

El análisis de las láminas citológicas (conteo diferencial y morfometría) se llevó a cabo en el laboratorio de Fisiología Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.



Figura 3. Puerta principal del camal municipal del distrito de Ninacaca en el departamento de Cerro de Pasco.

3.2. MATERIALES

3.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Se emplearon dieciocho fetos, los cuales fueron agrupados en tercios de gestación de acuerdo a su edad gestacional de acuerdo a lo estudiado por Mendoza (2012):

- Primer tercio: de 0 a 110 días
- Segundo tercio: de 111 a 220 días
- Tercer tercio: de 221 días a más

Los fetos procedían de alpacas gestantes de descarte y beneficiadas en el matadero Municipal de Ninacaca en el departamento de Cerro de Pasco, las cuales se encontraban libres de anormalidades hematológicas.

3.2.2. MATERIALES PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS

- Kit de disección
- Vernier o Calibrador profesional Litz®
- Hojas de bisturí
- Laminas portaobjetos
- Gradilla de plástico
- Guantes de látex
- Tubos de colección sanguínea con anticoagulante
- Capilares para microhematocrito sin anticoagulante

3.2.3. EQUIPOS Y MATERIALES PARA HEMOGRAMA

- Microcentrífuga para capilares de microhematocrito
- Agitador para pipetas (Shaker)
- Pipetas de Thoma para glóbulos blancos
- Pipetas de Thoma para glóbulos rojos
- Pipetas de Shali
- Cámaras de Neubauer
- Laminillas para cámara de Neubauer
- Mechero de Bunsen
- Balón de gas
- Reactivo de Drabkin
- Dilutor de glóbulos rojos
- Dilutor de glóbulos blancos

3.2.4. MATERIALES PARA TINCIÓN DE MUESTRAS CITOLÓGICAS

- Colorante Wright
- Solución Buffer (Agua destilada)
- Mangueras de goma
- Cronómetro

- Secadora
- Algodón

3.2.5. MATERIALES PARA ANÁLISIS DE MUESTRAS

- Microscopio de inmersión con luz artificial (4x, 10x, 40x, 100x).
- Microscopio binocular de inmersión con cámara incorporada marca Leica® modelo ICC50 HD.
- Aceite de inmersión
- Software de medición y microfotografía LAS X 3.0 desarrollado por Leica®.
- Software de análisis de datos Excel 2010 desarrollado por Microsoft®.

3.3. METODOLOGÍA

3.3.1. HEMATOLOGÍA EN HEMBRAS GESTANTES

A fin de asegurar que las muestras de médula ósea de los fetos procedan de hembras gestantes libres de patologías sistémicas (previo al sacrificio se seleccionó e identificó a las hembras presentes, siendo 20 en total de las cuales solo 18 estaban preñadas como se pudo comprobar al momento del sacrificio), se colectó muestras de sangre periférica (3 mililitros) en el momento del sacrificio (sangría de la vena yugular) en un tubo de muestra sanguínea con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), luego se homogenizó la muestra manualmente para colectar con ayuda de un capilar sin anticoagulante una gota de sangre la cuál fue depositada en el extremo de una lámina portaobjetos libre de grasa (Figura 4), para la realización del frotis, un segundo portaobjetos con el borde en un ángulo de 45° con respecto a la superficie del primer portaobjetos, se deslizó con un movimiento rápido hacia el extremo opuesto del primer portaobjetos, arrastrando la sangre de manera uniforme para conseguir una película fina de sangre y homogéneamente distribuida.

Las muestras sanguíneas y frotis sanguíneos fueron enviadas el mismo día de colección, teniendo en cuenta las consideraciones de transporte requeridas, al Laboratorio de Patología

Clínica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para la determinación del hematocrito, hemoglobina, recuento de glóbulos rojos y blancos así como el recuento diferencial de leucocitos y número de plaquetas.



Figura 4. Preparación del frotis sanguíneo de hembras alpacas gestantes.

3.3.2. DETERMINACIÓN DE LA EDAD GESTACIONAL

Con el objetivo de obtener la edad gestacional de los fetos de alpaca en estudio se utilizó el diámetro biparietal (DBP), medido con un vernier o calibrador de precisión marca Litz® (Figura 5 y 6), como medida biométrica fetal de referencia; ya que esta sigue un modelo de desarrollo continuo durante la etapa fetal; esta medida biométrica fue utilizada por Gazitua *et al.* (2001) para predecir la edad gestacional en llamas y alpacas con la siguiente fórmula:

$$\text{Edad gestacional} = (\text{DBP} - 0.11376) * 47.23287, r = 0.98, P < 0.001$$

DBP: Diámetro biparietal fetal en centímetros

r: coeficiente de regresión

P: significancia

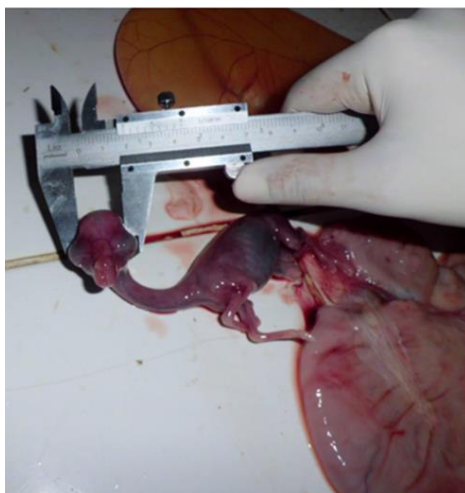


Figura 5. Medición del diámetro biparietal (DBP): 1.705 centímetros en un feto de alpaca de 75.2 días de edad gestacional.



Figura 6. Medición del diámetro biparietal (DBP): 7.25 centímetros en un feto de alpaca de 337.1 días de edad gestacional.

3.3.3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS CITOLÓGICAS

Las muestras para estudio citológico se obtuvieron mediante sección de segmentos de costilla a fin de obtener directamente la médula ósea fetal, ya que con esta técnica se valora mejor la morfología individual de las células, se identifica los tipos celulares y por tanto se realiza el recuento diferencial y determina la relación mieloide/eritroide (M/E) (Aceña *et al.*, 1992), Con ayuda de una hoja de bisturí, se retiró cuidadosamente los fetos del líquido amniótico (Figura 7), paso seguido, se procedió a la palpación de las costillas, teniendo como puntos de referencia la

7°, 8° y 9° unión costochondral. El área justo por encima de la unión costochondral fue elegida para la extracción de 2 a 3 cm de las costillas 8° y 9° (figura 9). Una vez retirado los fragmentos de costilla se procedió a presionar con una pinza hemostática uno de los extremos en dirección al otro extremo a fin de depositar una gota de médula a 1.5 cm del extremo de una lámina portaobjetos para realizar la extensión por la técnica de aplastamiento (Figura 8). Se prepararon tres láminas con muestras de médula ósea de cada feto de alpaca.

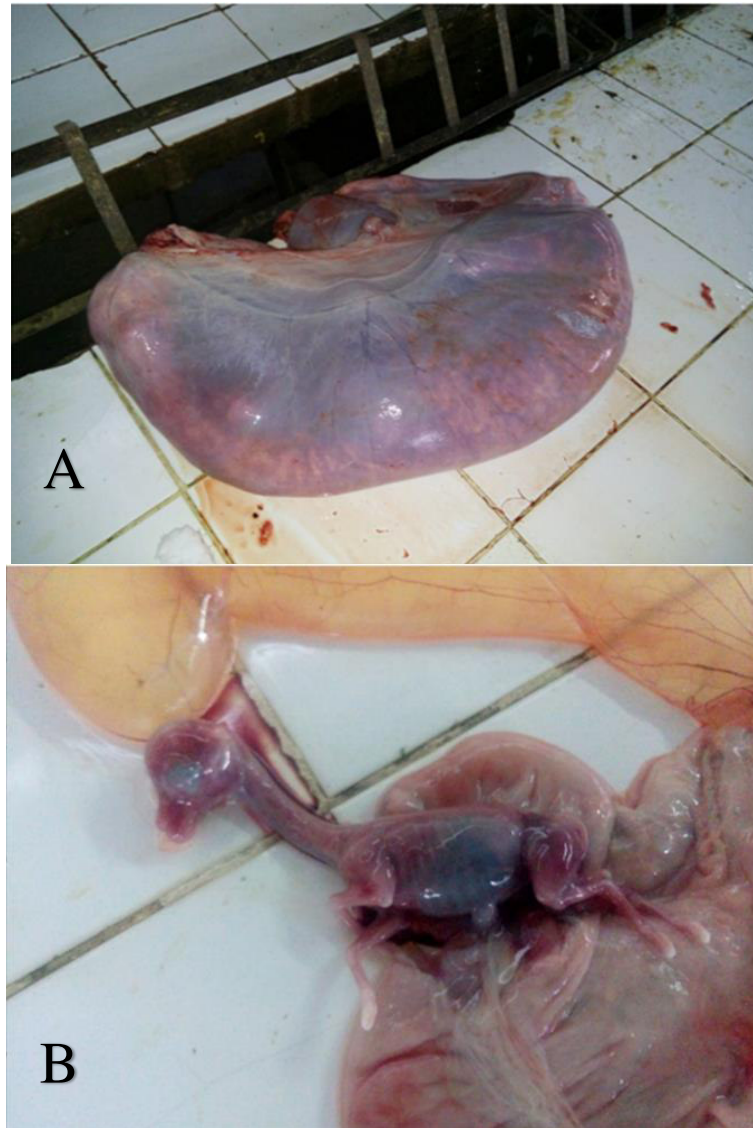


Figura 7. Exposición del feto de alpaca: (A) feto del último tercio de gestación aún dentro de la placenta; (B) feto del primer tercio de gestación liberado de la placenta y líquido amniótico.

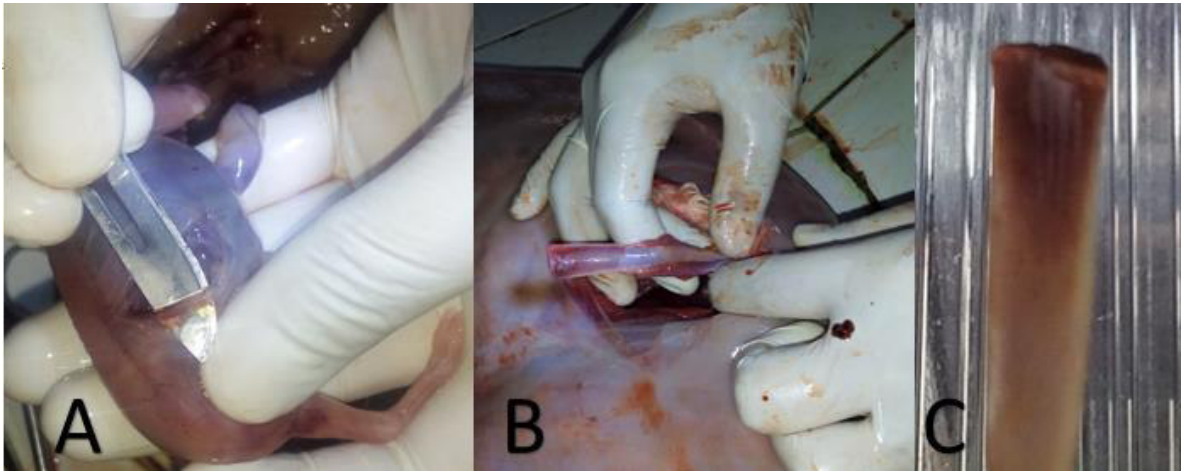


Figura 8. Exposición de costilla de feto de alpaca: (A) disección de 8ª costilla en feto de alpaca de primer tercio de gestación, (B) exposición de 8ª costilla en feto de alpaca del último tercio de gestación, (C) Se observa la médula ósea en el extremo superior de la costilla extraída.



Figura 9. Colocación de muestra de médula ósea en lámina portaobjeto: Presión en el fragmento de costilla con una pinza hemostática y depósito de una gota de médula ósea en un extremo de lámina portaobjeto.

3.3.4. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

- **Tinción**

Una vez en el laboratorio, las láminas se tiñeron con colorante Wright, para esto primero se cubrió la lámina con el colorante, luego de 10 minutos se agregaron 10 a 12 gotas de buffer (agua destilada) y luego se homogenizó soplando suavemente con ayuda de una manguera de goma. Finalmente, 8 a 10 minutos después de agregar el buffer, se realizó el lavado de la lámina con agua a discreción. El exceso de humedad de la lámina se retiró con ayuda de una secadora de mano a manera vertical (Li *et al.*, 2017).

3.3.5. EVALUACIÓN CITOLÓGICA Y ANÁLISIS DE DATOS

La evaluación en general de extendidos de médula ósea es mayormente subjetiva, es por eso que deben repetirse al menos tres veces cada criterio a evaluar a fin de garantizar una correcta lectura e interpretación de los resultados; todos los criterios evaluados fueron recogidos en una base de datos y ordenados a fin de obtener parámetros de estadística descriptiva (media, desviación estándar y porcentajes).

- **Celularidad**

La celularidad se estima bajo el objetivo de 10 x en las espículas de la médula ósea comparando el porcentaje de células con la proporción de tejido graso (proporción de células a grasa). La celularidad normal oscila entre el 25% y el 75% de las células. La celularidad depende de la edad: las espículas de la médula ósea de los animales en crecimiento contienen aproximadamente el 75% de células, las de los adultos jóvenes el 50% y las espículas de la médula de los animales más viejos el 25% de las células (Harvey, 2001).

- **Recuento diferencial**

Se realizó tres conteos diferenciales (uno por cada lámina) de 500 células cada uno por cada feto de alpaca al objetivo de 100x con la finalidad de clasificar y caracterizar a los precursores de la médula ósea de cada una de las series celulares, La clasificación de las células de la serie eritroide incluye rubriblastos, prorubricitos, rubricitos basófilos, rubricitos policromatófilos y metarrubricitos. La clasificación de las células de la serie mieloide incluye mieloblastos, promielocitos, mielocitos, metamielocitos, abastados y

segmentados. También se tomó en cuenta la serie trombocítica (megacarioblastos, promegacariocitos y megacariocitos), osteoblastos, osteoclastos, células linfoides, macrófagos y mastocitos. Las células reticulares y de características que no permitan su clasificación se tomaron como células “indiferenciadas”.

- **Relación Mieloide-Eritroide (M/E)**

La relación M/E se determina dividiendo el número total de células nucleadas de la serie mieloide entre el número total de células nucleadas de la serie eritroide; este cociente nos indica la relación de la línea Mieloide con respecto a la línea eritroide la cual puede variar por diferentes causas tanto patológicas como fisiológicas (Weiss y Wardrop, 2011).

- **Índice de maduración eritroide y mieloide**

Estos índices se realizan para determinar asincronías en la maduración celular; el índice de maduración eritroide es una suma de células eritroides (metarubricitos), dividida por la suma de las células eritroides en fase proliferativa (rubriblasto, prorubricito y rubricitos); el índice de maduración mieloide es la suma de células mieloides en maduración (metamielocitos, abastoados y segmentados), dividida por la suma de las células mieloides en fase proliferativa (mieloblastos, promielocitos y mielocitos) (Martínez de Merlo, 2008)

- **Morfometría celular**

Se busca obtener valores cuantitativos sobre la forma de las células observadas, para lo cual se realizó 5 mediciones, en micrómetros, por cada tipo de célula observada considerando dos diámetros: longitudinal y transversal. Esto se realizó con el Software de medición y microfotografía LAS X 3.0 desarrollado por Leica®. Se promediaron las cinco medidas para obtener una medida representativa por cada tipo de célula.

- **Microfotografía**

Se obtuvieron microfotografías a diferentes escalas y objetivos, de acuerdo al tipo de célula a investigar. Esto se realizó con el Software de medición y microfotografía LAS X 3.0 desarrollado por Leica®.

IV. RESULTADOS

4.1. EVALUACIÓN HEMATOLÓGICA DE HEMBRAS GESTANTES

Se realizó el hemograma completo de 18 hembras gestantes para descartar y se promediaron los valores obtenidos de tal forma que se permita comparar con los valores de referencia expuestos por Fowler y Bravo (2011) (Cuadro 1), obteniendo valores dentro de los parámetros establecidos, además a la evaluación cualitativa de los extendidos sanguíneos (figura 10) no se observaron cambios que indiquen patologías que involucren a las diferentes líneas celulares hematológicas tales como anemia, leucemia, etc.

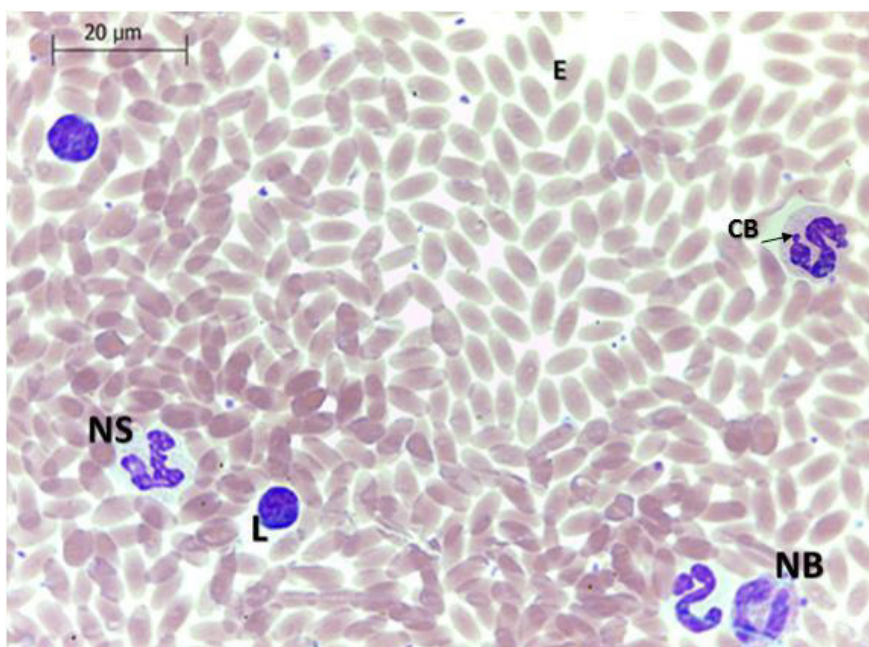


Figura 10. Extendido de sangre periférica de hembra alpaca gestante, (E) eritrocito con forma elíptica característica de camélidos, (NS) Neutrófilo segmentado, (CB) Corpúsculo de Barr (exclusivo de hembras), (L) linfocito con alta relación núcleo-citoplasma, (NB) Neutrófilo abastonado. Tinción Wright. 100x.

Cuadro 1. Promedio de valores hematológicos de 18 hembras alpaca gestantes

	Promedio hembras (n=18)	Desviación Estandar	Valores de Referencia (Fowler y Bravo, 2011)
Hematocrito (%)	39.3	5.06	27 - 45
Hemoglobina (g/dL)	15.31	1.73	11.9 - 19.4
G. rojos (cél/μL)	11' 860,000	221,773.21	10' 500,000 - 17' 200,000
Leucocitos (cél/μL)	12039	4210.39	8000 - 21400
Abastondados (%)	0.1	0.31	0 - 1
Neutrofilos (%)	49.4	10.47	41.7 - 72.9
Valor absoluto (cél/μL)	6104.62	2996.2	4711 - 14868
Linfocitos (%)	38.2	9.74	9.2 - 25.2
Valor absoluto (cél/μL)	4432.375	1473.23	689 - 4848
Eosinófilos (%)	9.1	3.18	2.2 - 21.4
Valor absoluto (cél/μL)	1065.66	471.38	647 - 4867
Basófilos (%)	1.25	1.16	0 - 14
Valor absoluto (cél/μL)	160.995	177.49	0 - 298
Monocitos (%)	1.95	2.44	0 - 4.6
Valor absoluto (cél/μL)	263.45	373.88	0-1009
Plaquetas (cell/μl)	318825	132859.67	200000 - 600000

Promedio de hemograma completo de 18 hembras alpacas gestantes y de descarte

4.2. EDAD GESTACIONAL EN FETOS DE ALPACA

A través del diámetro biparietal se obtuvo la edad gestacional en días (Cuadro 2) de los fetos de alpaca obtenidos de acuerdo a Gazitúa *et al.* (2001), así como también se clasificó a los fetos en tercios de gestación (CTG) de acuerdo a Mendoza (2012), obteniendo tres fetos en el primer

tercio gestacional, cinco fetos en el segundo tercio de gestación y diez fetos del último tercio gestacional.

Cuadro 2. Edad gestacional de 18 fetos de alpaca clasificados según el tercio de gestación (TG)

	DBP (Centímetros)	Edad (Días)	TG
F-01	1.705	75.2	Primero
F-02	1.950	86.7	Primero
F-03	2.150	96.2	Primero
F-04	2.685	121.4	Segundo
F-05	3.050	138.7	Segundo
F-06	3.100	141.0	Segundo
F-07	4.380	201.5	Segundo
F-08	4.755	219.2	Segundo
F-09	5.435	251.3	Tercero
F-10	5.490	253.9	Tercero
F-11	5.780	267.6	Tercero
F-12	6.015	278.7	Tercero
F-13	6.220	288.4	Tercero
F-14	6.245	289.6	Tercero
F-15	6.650	308.7	Tercero
F-16	6.705	311.3	Tercero
F-17	7.185	334.0	Tercero
F-18	7.250	337.1	Tercero

*Edad gestacional = (DBP-0.11376)*47.23287, $r = 0.98$, $P < 0.001$; DBP: Diámetro biparietal fetal en centímetros; r : coeficiente de regresión y P : significancia. (Gazitua et al., 2001)*

Primer tercio: < 110 días; Segundo tercio: <220; Tercer tercio: >221 (Mendoza, 2012)

4.3. CELULARIDAD EN MUESTRAS DE MÉDULA ÓSEA

La celularidad de las muestras obtenidas fue evaluada bajo en objetivo de 10x (Cuadro 3), obteniendo bajos porcentajes en el primer tercio de gestación (Figura 11), hasta porcentajes altos en el último tercio de gestación (Figura 12).

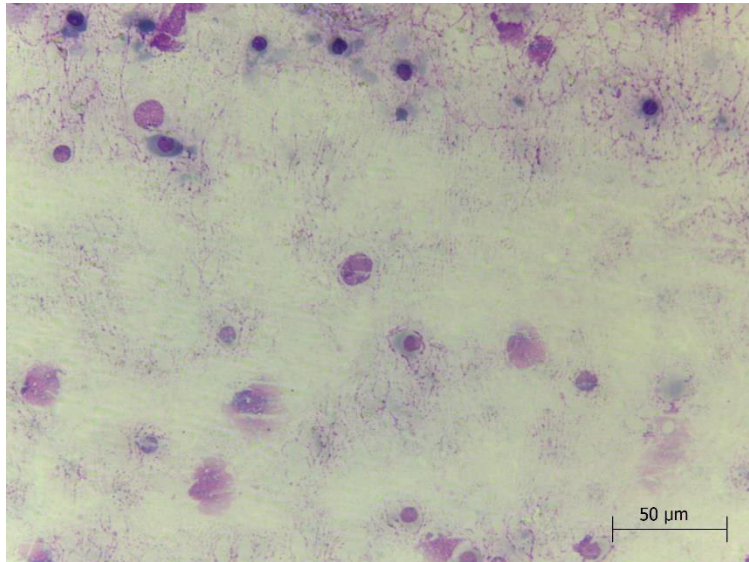


Figura 11. Celularidad de 15% en extendido citológico de médula ósea en feto de alpaca de 96.2 días. Tinción Wright. 10x.

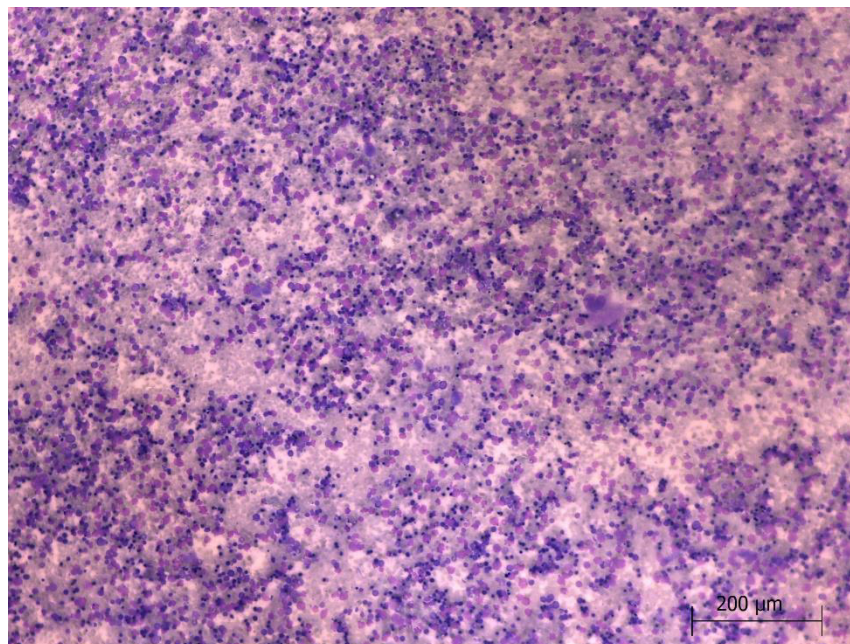


Figura 12. Celularidad de 95% en extendido citológico de médula ósea en feto de alpaca de 337.1 días. Tinción Wright. 10x.

Cuadro 3. Porcentaje de celularidad de muestras de médula ósea de 18 fetos de alpaca, clasificados según el tercio de gestación

	Edad (Días)	Tercio	Celularidad
F-01	75.16	Primero	18%
F-02	86.73	Primero	15%
F-03	96.18	Primero	15%
F-04	121.45	Segundo	20%
F-05	138.69	Segundo	25%
F-06	141.05	Segundo	25%
F-07	201.51	Segundo	50%
F-08	219.22	Segundo	55%
F-09	251.34	Tercero	55%
F-10	253.94	Tercero	70%
F-11	267.63	Tercero	70%
F-12	278.73	Tercero	75%
F-13	288.42	Tercero	75%
F-14	289.60	Tercero	85%
F-15	308.73	Tercero	80%
F-16	311.32	Tercero	90%
F-17	333.99	Tercero	85%
F-18	337.07	Tercero	95%

4.4. MORFOMETRÍA CELULAR

Con el software de medición y microfotografía LAS X 3.0 desarrollado por Leica® se realizaron cinco mediciones en micrómetros (μm) de cada tipo de célula observada en las muestras citológicas de médula ósea del diámetro longitudinal y trasversal, para finalmente obtener el promedio de las mismas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Promedio de diámetros longitudinal y trasversal de los diferentes tipos de células observadas en muestras citológicas de médula ósea de 18 fetos de alpaca de diferentes edades gestacionales

	Promedio (μm)			
	Diámetro L	DsvEs L	Diámetro T	DsvEs T
Rubroblasto	18.25	1.94	16.64	1.12
Prorubricito	12.69	1.29	10.60	1.42
Rubricito basófilo	10.28	0.62	8.30	0.51
Rubricito policromatófilo	8.16	0.52	6.75	0.54
Metarubricito	5.13	0.53	4.46	0.56
Mieloblasto	16.38	0.96	12.20	0.44
Promielocito	16.37	1.01	15.39	1.80
Mielocito neutrófilo	12.47	1.06	11.28	0.85
Metamielocito neutrófilo	10.82	1.89	9.48	1.30
Abastonado neutrófilo	9.40	1.71	7.66	1.77
Segmentado neutrófilo	9.42	1.35	8.06	1.94
Mielocito eosinófilo	13.32	1.73	10.48	0.91
Metamielocito eosinófilo	11.23	2.03	9.74	1.58
Abastonado eosinófilo	10.79	2.34	9.27	1.55
Segmentado eosinófilo	9.50	1.08	8.04	1.73
Mielocito basófilo	13.78	2.18	11.06	2.25
Metamielocito basófilo	10.28	1.42	10.02	1.71
Abastonado basófilo	10.36	1.47	9.06	1.23
Segmentado basófilo	10.68	0.86	7.48	0.80
Megacarioblasto	48.32	6.39	38.66	3.09
Promegacariocito	64.95	4.51	53.55	6.74
Megacariocito	77.02	6.68	67.52	7.17
Osteoblastos	21.70	4.39	14.90	1.51
Osteoclastos	52.73	13.91	59.65	15.78
Celulas linfoides	9.88	1.69	7.82	2.51
Mastocitos	9.08	1.38	7.77	1.69
Macrófagos	15.63	2.31	14.29	1.51
Celulas indiferenciadas	9.83	3.75	8.36	2.60

(L) Diámetro longitudinal, (T) Diámetro trasversal, (DsvEs) Desviación estándar

4.5. IDENTIFICACIÓN CELULAR

Se identificaron las diferentes células presentes en la médula ósea, de acuerdo a las características descritas en la revisión bibliográfica (Harvey, 2001; Brockus, 2011; Weiss y Wardrop, 2011)

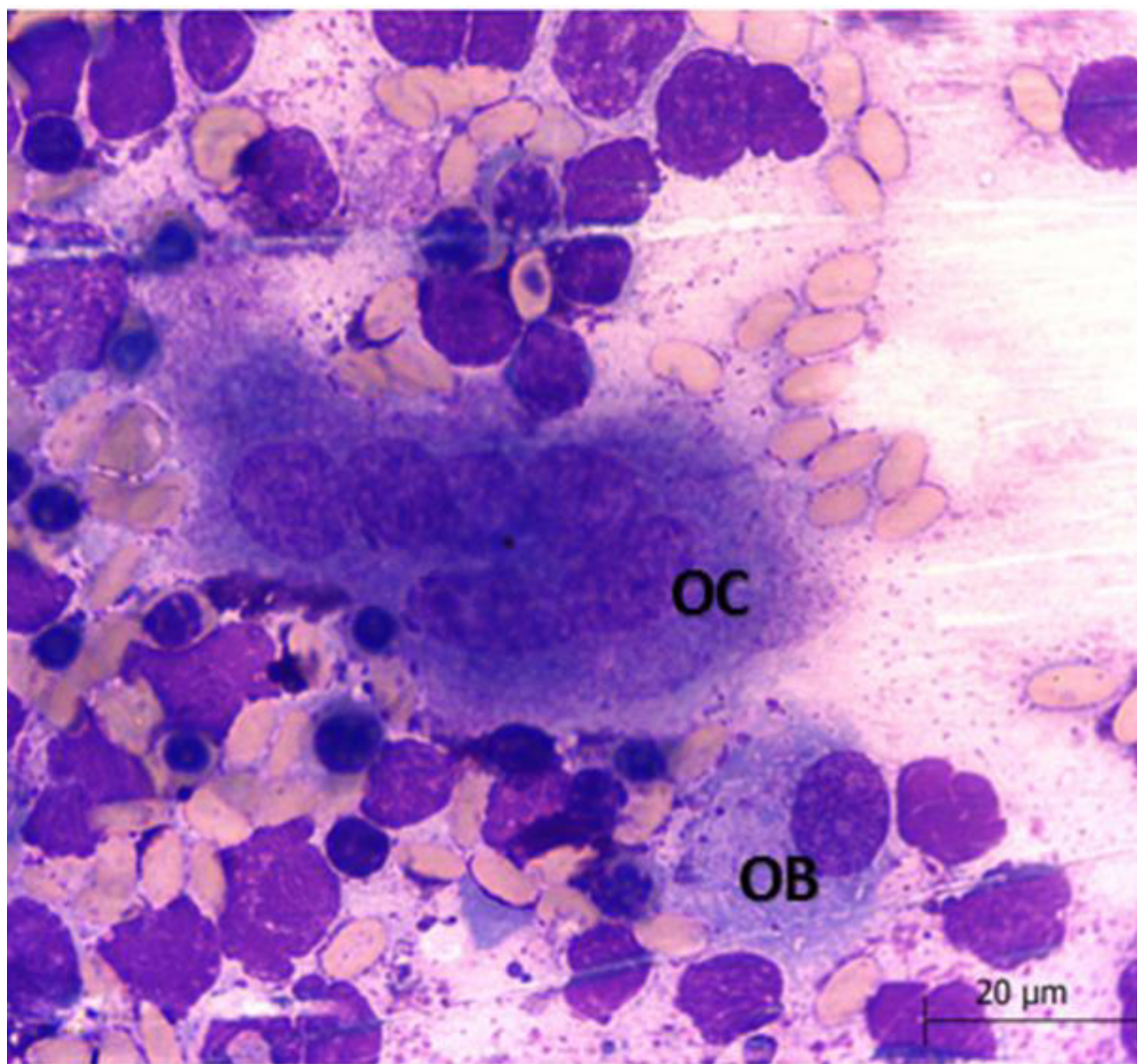


Figura 13. Osteoblasto (OB), célula con baja relación núcleo citoplasma, evidentes nucléolos y citoplasma basófilo. Osteoclasto (OC), célula muy grande multinucleada con citoplasma basófilo. En un feto de alpaca de 334 días. Tinción Wright. 100x.

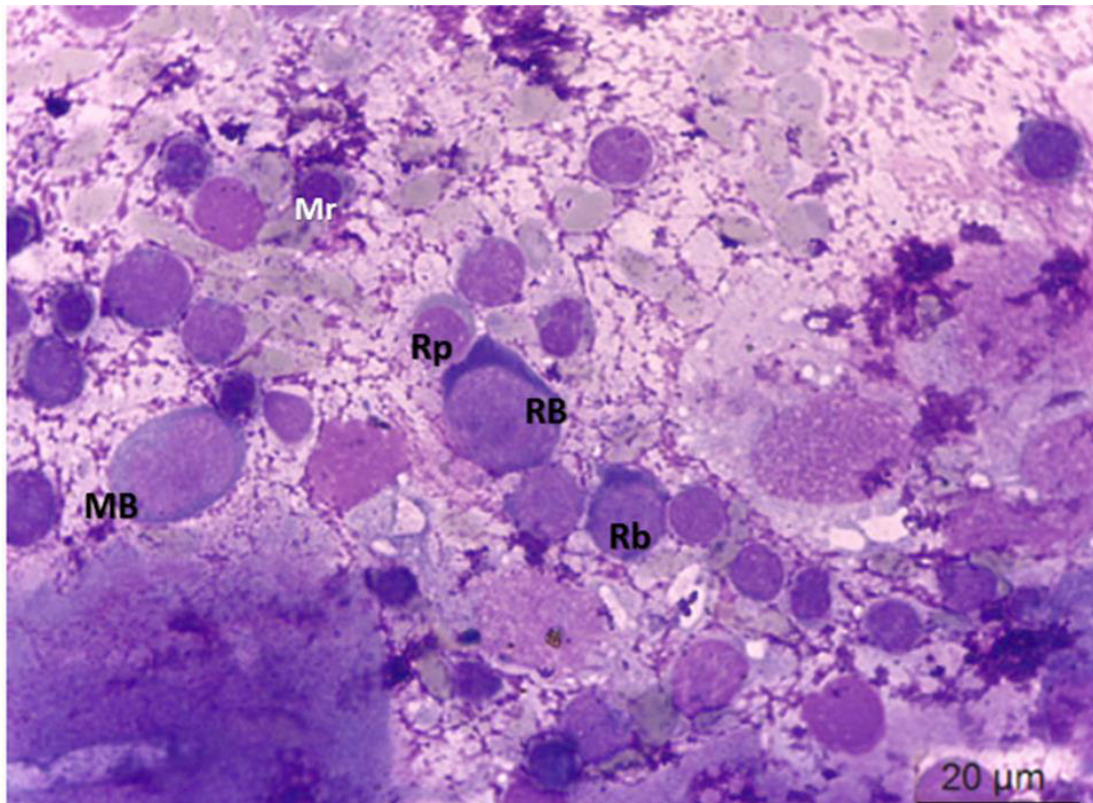


Figura 14. Diferentes células en médula ósea de feto de alpaca de 267.6 días: (MB) Mieloblasto, nótese el citoplasma basófilo. (RB) Rubroblasto, nótese el citoplasma intensamente basófilo. (Rb) Rubricito basófilo. (Rp) Rubricito policromatófilo. (Mr) Metarubricito. Nótese como en las tres últimas células el núcleo tiende a volverse cada vez más picnótico. Tinción Wright. 100x.

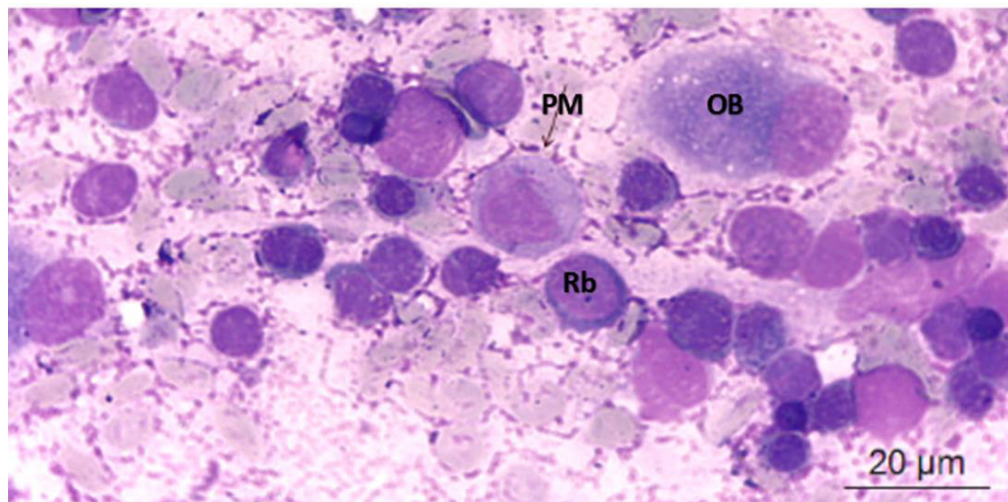


Figura 15. Diferentes tipos celulares en médula ósea de feto de alpaca de 201.5 días. (OB) Osteoblasto. (PM) Promielocito, nótese como el núcleo va acercándose hacia el borde celular. (Rb) Rubricito basófilo. Tinción Wright. 100x.

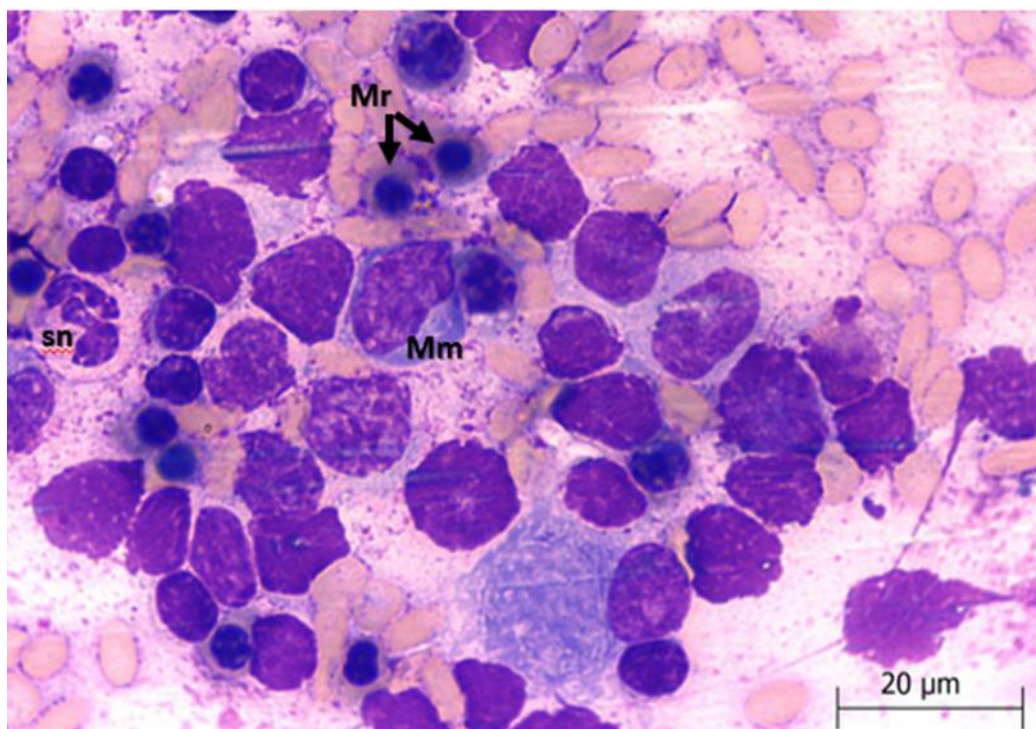


Figura 16. Diferentes células en médula ósea de feto de alpaca de 311.3 días. (Mm) metamielocito neutrófilo, nótese la escotadura central en el núcleo. (Mr) Metarubricitos señalados con flechas. (sn) segmentado neutrófilo. Tinción Wright. 100x.

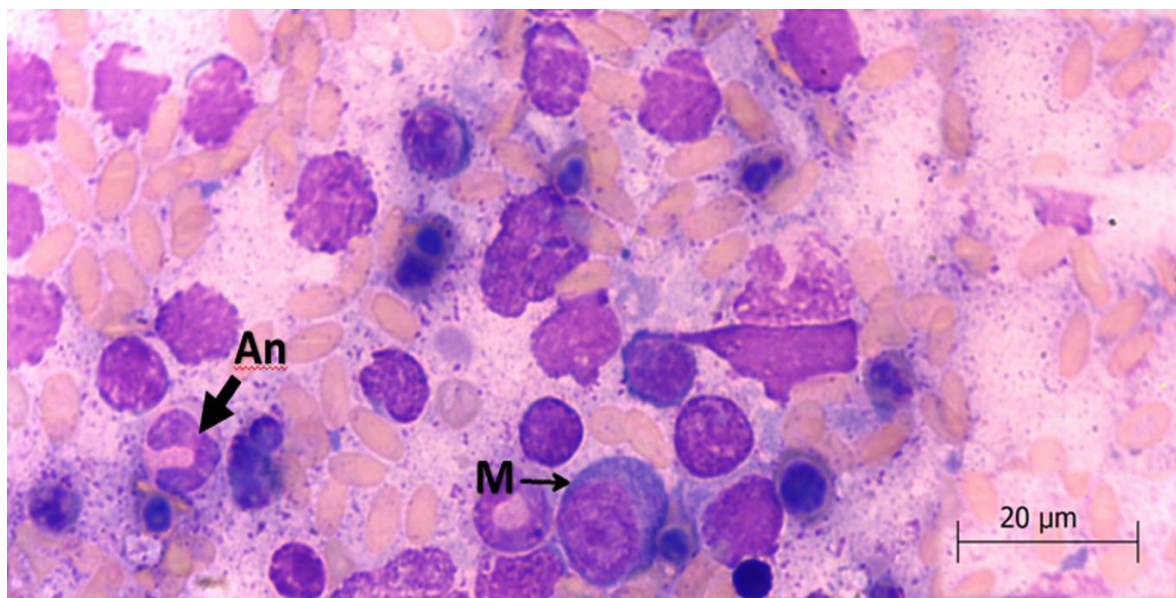


Figura 17. (M) Mielocito neutrófilo. (An) Abastonado neutrófilo. En médula ósea de feto de alpaca de 288.4 días. Tinción Wright. 100x.

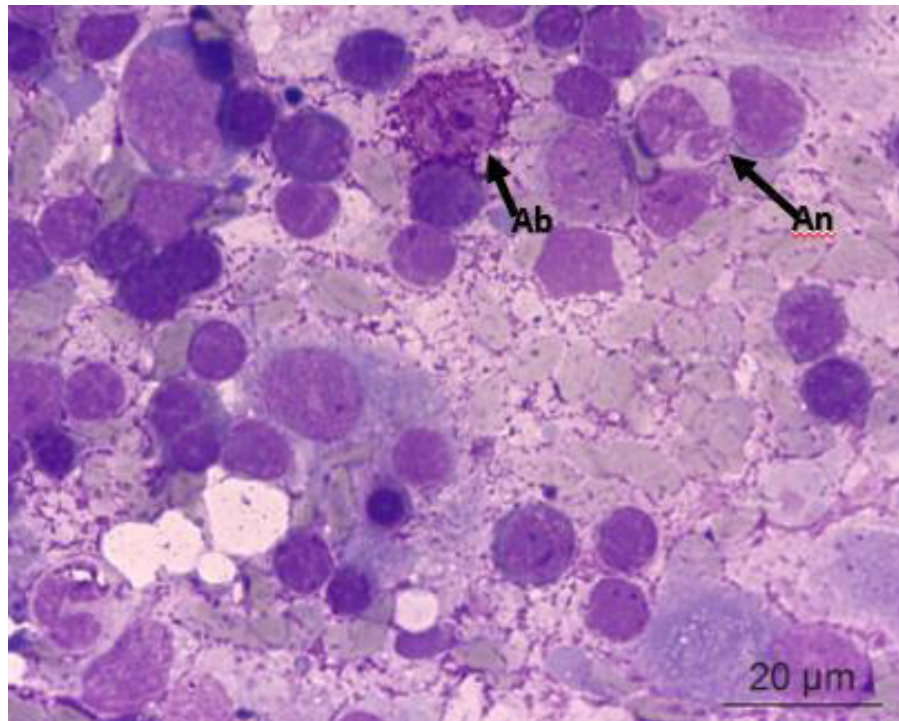


Figura 18. (Ab) Abastonado basófilo. (An) Abastonado neutrófilo. En médula ósea fetal de alpaca de 267.6 días. Tinción Wright. 100x.

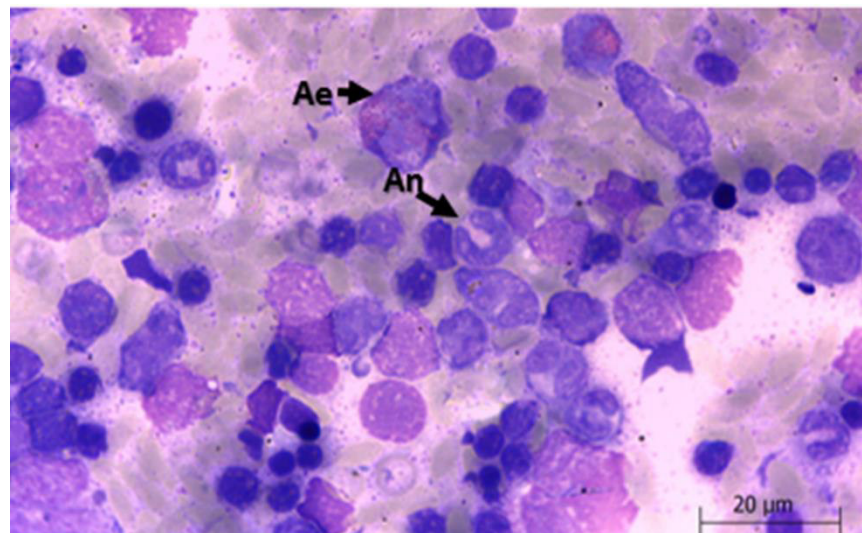


Figura 19. (Ae) Abastonado eosinófilo. (An) Abastonado neutrófilo. En médula ósea fetal de alpaca de 251.3 días. Tinción Wright. 100x.

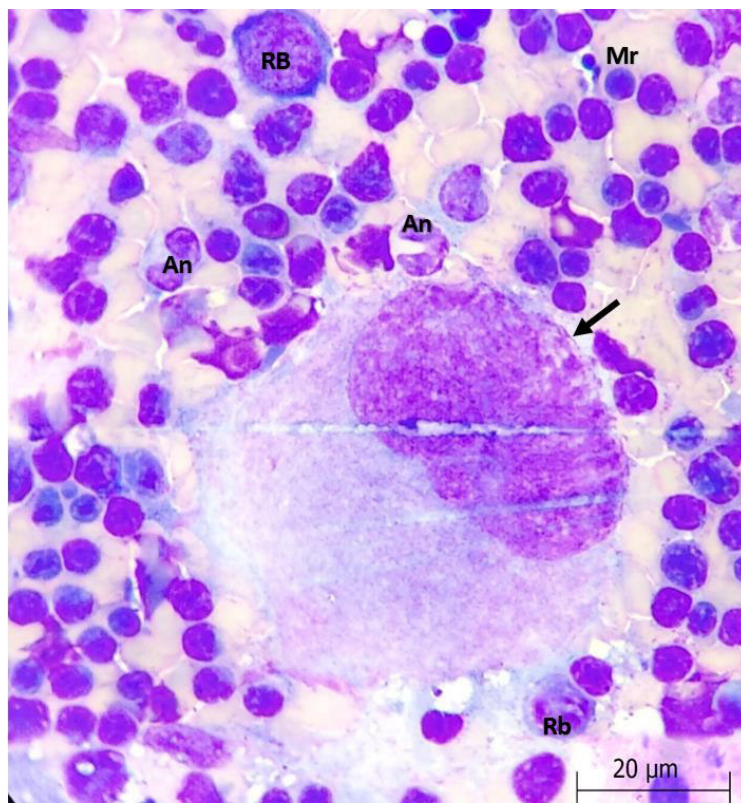


Figura 20. Megacariocito (flecha) en médula ósea fetal de alpaca de 337.1 días; (RB) Rubroblasto; (Rb) Rubricito basófilo; (Mr) Metarubricito; (An) Abastonado neutrófilo. Tinción Wright. 100x.

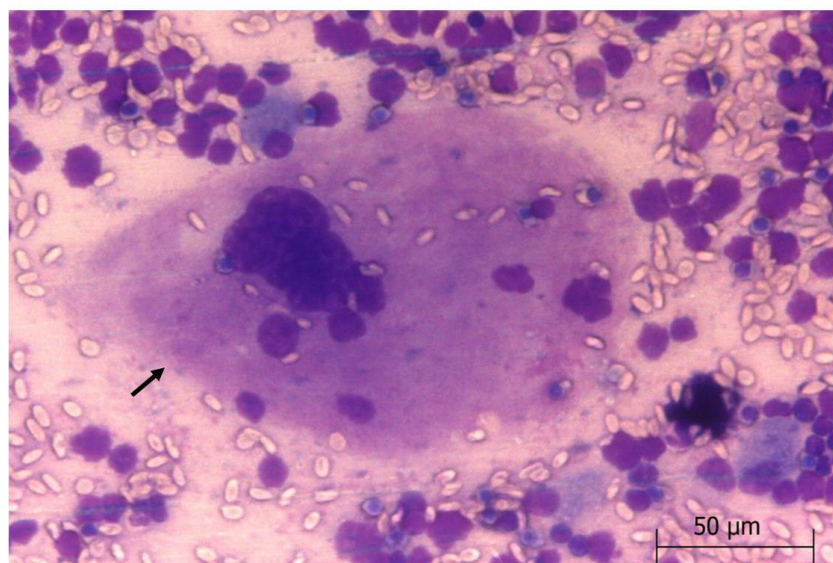


Figura 21. Megacariocito (flecha) con núcleo lobulado y cromatina condensada sin nucléolos, en médula ósea fetal de alpaca de 334 días. Tinción Wright. 40x.

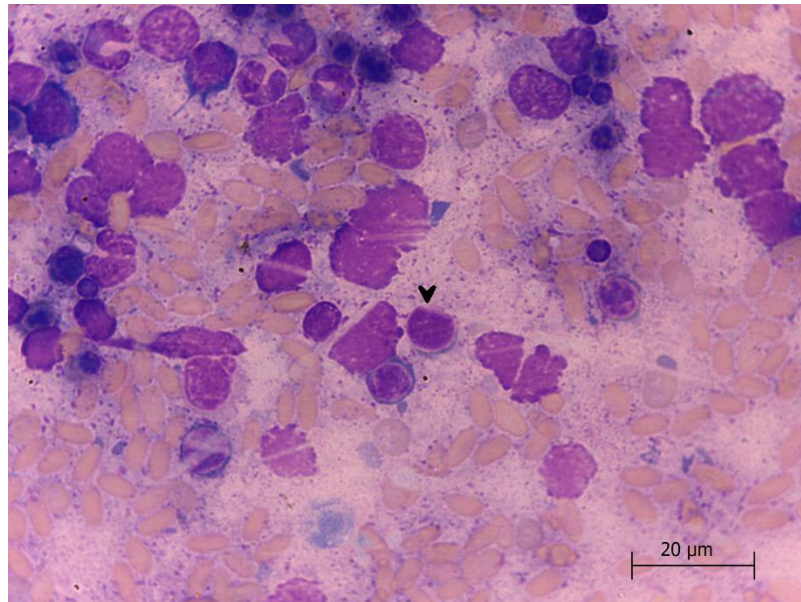


Figura 22. Célula linfoide señalada por punta de flecha, nótese la alta relación núcleo citoplasma. En médula ósea fetal de alpaca de 334 días. Tinción Wright. 40x.

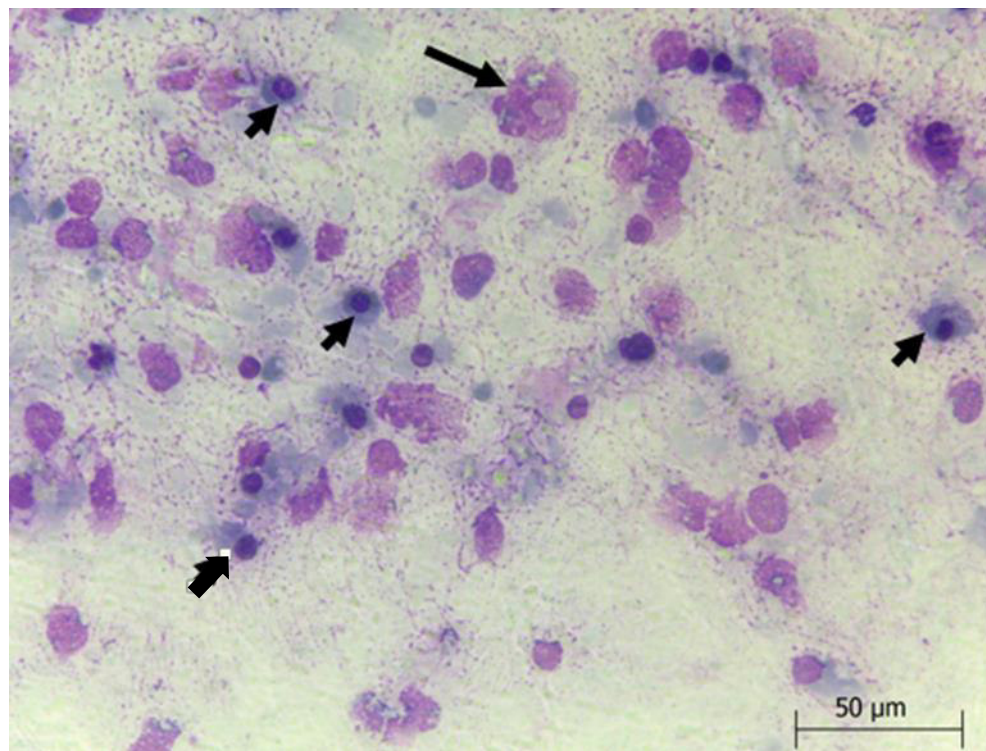


Figura 23. Macrófago (flecha larga) y células indiferenciadas (flechas cortas), nótese en estas últimas la diferencia en la morfología citoplasmática y nuclear. En médula ósea fetal de alpaca de 86.2 días. Tinción Wright. 40x

4.6. RECUENTO DIFERENCIAL

Se obtuvo la composición porcentual citológica de los extendidos de médula ósea por cada feto en los diferentes tercios de gestación, generando promedios y agrupándolos por cada tercio.

En el primer tercio (Cuadro 5) se identificó y contó únicamente células indiferenciadas (aquellas que por sus características no es posible clasificarlas en algún tipo celular descrito en la literatura) y macrófagos.

En el segundo tercio (Cuadro 6) de gestación a partir del feto de 201.5 días en adelante, se pudo identificar y contar células precursoras.

En el último tercio (Cuadro 7) de gestación se contó e identificó todos los tipos de células descritos en la revisión bibliográfica.

Cuadro 5. Composición porcentual citológica de médula ósea de fetos de alpaca en el primer tercio de gestación.

	Promedio (%) (n=3)	Desviación Estándar
Macrófagos	3.04	1.27
Celulas indiferenciadas	96.96	2.78

Fetos de edades gestacionales: 75.2, 86.7 y 96.2 días.

Se contaron 29, 37 y 55 células, respectivamente para las tres mediciones debido a la escasa celularidad de las muestras.

Cuadro 6. Composición porcentual citológica de médula ósea de fetos de alpaca en el segundo tercio de gestación

Parámetro	Promedio (%) (n=5)	Desviación Estándar
Rubroblasto	0.17	0.20
Prorubricito	0.32	0.58
Rubricito basófilo	1.19	2.89
Rubricito policromatófilo	2.78	2.55
Metarubricito	5.71	6.18
Total de células eritrocíticas	10.17	
Mieloblasto	0.10	0.06
Promielocito	0.14	0.06
Mielocito neutrófilo	0.34	1.21
Metamielocito neutrófilo	0.67	1.27
Abastonado neutrófilo	0.23	
Segmentado neutrófilo	1.84	2.24
Mielocito eosinófilo	0.22	0.08
Metamielocito eosinófilo	0.30	0.04
Abastonado eosinófilo	0.40	0.20
Segmentado eosinófilo	0.76	1.87
Mielocito basófilo	0.00	0.00
Metamielocito basófilo	0.04	0.06
Abastonado basófilo	0.00	0.00
Segmentado basófilo	0.00	0.00
Total de células granulocíticas	5.03	
Osteoblastos	55.50	8.00
Osteoclastos	2.30	0.74
Megacarioblasto	0.04	0.00
Promegacariocito	0.00	0.02
Megacariocito	0.08	0.02
Celulas linfoides	0.55	1.52
Mastocitos	0.00	
Macrófagos	2.54	0.98
Celulas indiferenciadas	23.80	15.58
Total de otras células	84.80	

Cuadro 7. Composición porcentual citológica de médula ósea de fetos de alpaca en el último tercio de gestación

Parámetro	Promedio (%) (n=10)	Desviación Estándar
Rubroblasto	0.98	0.43
Prorubricito	1.54	0.79
Rubricito basofilo	4.94	1.02
Rubricito policromatófilo	8.71	3.34
Metarubricito	23.82	6.98
Total de células eritrocíticas	39.99	
Mieloblasto	0.59	0.42
Promielocito	0.82	0.55
Mielocito neutrófilo	1.16	0.52
Metamielocito neutrófilo	1.55	0.72
Abastonado neutrófilo	7.95	4.25
Segmentado neutrófilo	9.00	3.86
Mielocito eosinófilo	0.72	0.43
Metamielocito eosinófilo	0.69	0.43
Abastonado eosinófilo	1.66	0.66
Segmentado eosinófilo	2.16	0.75
Mielocito basófilo	0.16	0.12
Metamielocito basófilo	0.12	0.10
Abastonado basófilo	0.15	0.12
Segmentado basófilo	0.25	0.18
Total de células granulocíticas	26.99	
Osteoblastos	22.18	8.19
Osteoclastos	1.35	0.56
Megacarioblasto	0.18	0.06
Promegacariocito	0.21	0.10
Megacariocito	0.41	0.07
Celulas linfoides	1.36	0.63
Mastocitos	0.12	0.10
Macrófagos	1.44	0.70
Celulas indiferenciadas	5.96	3.95
Total de otras células	33.21	

4.7. RELACIÓN MIELOIDE/ERITROIDE

Cuadro 8. Relación Mieloide/Eritroide (M/E) y promedios según el tercio de gestación en 18 fetos de alpaca.

	Edad (Días)	Tercio de gestación	Relación Mieloide/Eritroide (M/E)*
F-01	75.2	Primero	0.00
F-02	86.7	Primero	0.00
F-03	96.2	Primero	0.00
Promedio primer tercio			0.00
F-04	121.4	Segundo	0.00
F-05	138.7	Segundo	0.00
F-06	141.0	Segundo	0.00
F-07	201.5	Segundo	0.20
F-08	219.2	Segundo	0.73
Promedio segundo tercio			0.47 ± 0.27
F-09	251.3	Tercero	0.62
F-10	253.9	Tercero	0.58
F-11	267.6	Tercero	0.76
F-12	278.7	Tercero	0.44
F-13	288.4	Tercero	1.07
F-14	289.6	Tercero	0.83
F-15	308.7	Tercero	0.74
F-16	311.3	Tercero	0.77
F-17	334.0	Tercero	0.46
F-18	337.1	Tercero	0.60
Promedio último tercio			0.69 ± 0.19

* Obtenida dividiendo el porcentaje de células de línea granulocítica entre las células nucleadas de la línea eritroide, en un conteo de 500 células

4.8. ÍNDICE DE MADURACIÓN ERITROIDE Y MIELOIDE

Cuadro 9. Índice de maduración eritroide y mieloide (cociente de precursores en maduración entre los precursores en fase proliferativa) en fetos de alpaca en el segundo tercio de gestación.

Rubroblastos	1.72%
Prorubricitos	3.18%
Rubricitos Basófilos	11.67%
Rubricitos Policromatófilos	27.30%
Metarubricitos	56.13%
Índice de maduración eritroide	3.28
Mieloblastos	1.93%
Promielocitos	2.71%
Mielocitos Neutrófilos	6.80%
Metamielocitos Neutrófilos	13.27%
Abastondados Neutrófilos	4.60%
Segmentados neutrófilos	36.60%
Mielocitos Eosinófilos	4.32%
Metamielocitos Eosinófilos	6.02%
Abastondados Eosinófilos	7.85%
Segmentados Eosinófilos	15.12%
Mielocito Basófilo	0.00%
Metamielocito Basófilo	0.78%
Abastondado Basófilo	0.00%
Segmentado Basófilo	0.00%
Índice de maduración mieloide	9.40

Cuadro 10. Índice de maduración eritroide y mieloide (cociente de precursores en maduración entre los precursores en fase proliferativa) en fetos de alpaca en el último tercio de gestación.

Rubroblastos	2.46%
Prorubricitos	3.84%
Rubricitos Basófilos	12.36%
Rubricitos Policromatófilos	21.79%
Metarubricitos	59.56%
Índice de maduración eritroide	3.47
Mieloblastos	2.18%
Promielocitos	3.04%
Mielocitos Neutrófilos	4.32%
Metamielocitos Neutrófilos	5.76%
Abastionados Neutrófilos	29.47%
Segmenados neutrófilos	33.33%
Mielocitos Eosinófilos	2.67%
Metamielocitos Eosinófilos	2.56%
Abastionados Eosinófilos	6.17%
Segmentados Eosinófilos	7.99%
Mielocito Basófilo	0.58%
Metamielocito Basófilo	0.44%
Abastionado Basófilo	0.57%
Segmentado Basófilo	0.91%
Índice de maduración mieloide	6.80

V. DISCUSIÓN

La médula ósea se localiza en las cavidades de ciertos huesos en los mamíferos adultos (cuerpos vertebrales, costillas, esternón, huesos del cráneo, pelvis y epífisis proximales del fémur y húmero) y es el principal lugar de hematopoyesis (Grindem *et al.*, 2002). En ella se producen los eritrocitos, los granulocitos, los monocitos y las plaquetas, e incluso algunos linfocitos derivan de la médula ósea, aunque su principal lugar de producción sea el sistema linfático (Aceña *et al.*, 1992). En los animales en crecimiento, aparece en el interior de huesos largos y cortos y, a medida que envejecen, la región que corresponde al canal medular es substituida por tejido adiposo (Harvey, 2001).

Durante el desarrollo embrionario y fetal en mamíferos, las células precursoras de la hematopoyesis emergen y luego migran a través de diferentes tejidos y órganos; de esta forma Arias *et al.* (2011) describen agrupaciones de células correspondientes a nidos hematopoyéticos en la evaluación histológica del bazo fetal en alpaca de 55 días de gestación; además se ha reportado, mediante histología, la presencia de células hematopoyéticas en el timo de fetos de alpaca a partir de los 100 días de gestación (Montenegro, 2006). Finalmente la médula ósea interviene activamente en la hematopoyesis a mediados de la gestación en la mayoría de mamíferos (Morrison *et al.*, 1994, Ottersbach y Dziersak, 2005, Coskun y Hirschi, 2010). En el presente estudio, se evidenciaron células hematopoyéticas en médula ósea de características morfológicas similares a las descritas en adultos por diversos autores, a partir del feto de 201.5 días de edad gestacional, perteneciente al segundo tercio de gestación, mientras que no existe estudios sobre la ontogenia de la médula ósea en la alpaca, en otros mamíferos de gestaciones cortas como el ratón, a partir del día 16.5 de gestación se encontraron células en médula ósea con morfología y funcionabilidad similares a la de adultos (Coskun, 2014). Tiedemann y van Ooyen (1978) reportaron en fetos de gatos que al día 35 de gestación, la médula ósea era funcional.

Pessa-Morikawa *et al.* (2012) concluyeron que la médula ósea de fetos de bovinos entre 180 a 255 días de gestación presentó un alto potencial progenitor de células hematopoyéticas mediante marcadores de células CD34⁺; mientras que Battista *et al.* (2014) al estudiar fetos de equino demostraron que aproximadamente al día 100 de gestación el hígado y la médula ósea son sitios activos de hematopoyesis basados en marcadores de moléculas de diferenciación para leucocitos y mensajeros de señal para diferenciación de células hematopoyéticas. Estas últimas son especies de gestación larga (Bovinos: 9 meses; Equinos: 11 meses) al igual que la alpaca, lo cual explica la escasa celularidad observada en el primer tercio de gestación ($16\% \pm 0.2$) del presente estudio (únicamente células indiferenciadas y algunos macrófagos), mientras que la celularidad aumentó a $35\% \pm 0.16$ en el segundo tercio de gestación, finalmente en el último tercio gestacional la celularidad promedio fue de $78\% \pm 0.12$, este último valor concuerda con lo reportado para animales jóvenes por Andreasen *et al.* (1994) y Nazifi y Maleki (1998).

Las muestras citológicas de médula ósea de fetos de alpaca en el presente estudio, presentaron componentes celulares pertenecientes a las diversas líneas hematopoyéticas, con morfología (morfometría y descripción) similar a los demás mamíferos domésticos descritos por Harvey (2001), en base a esto se pudo identificar a los tipos celulares perteneciente a la línea eritroide, destacando principalmente los rubroblastos por la presencia de nucléolos y la intensa basofilia citoplasmática; en la línea mieloide o granulocítica se pudo identificar los precursores en fase proliferativa como los mieloblastos con presencia de nucléolos y promielocitos con el núcleo ligeramente excéntrico, a partir de estas células se diferenciaron los precursores mieloides de acuerdo a los gránulos citoplasmáticos secundarios que permitió clasificarlos en basófilos, neutrófilos y eosinófilos; en la línea trombocítica se identificaron megacarioblastos con relación núcleo citoplasma alta principalmente en fetos del último tercio de gestación, los megacariocitos se identificaron como las células más grandes en el presente estudio y presentaron múltiples lobulaciones nucleares, en algunos casos aglomeradas. La evidencia de componentes hematopoyéticos en médula ósea de fetos de alpaca del presente estudio concuerda con lo reportado por Bendezú (1954) el cual utilizó 11 alpacas aparentemente normales de entre dos a siete años, nacidas en Lima, y mediante histología de médula ósea esternal observó: eritroblastos, prorubricitos, rubricitos, metarubricitos, mieloblastos, promielocitos, mielocitos, metamielocitos, abastionados, segmentados y megacariocitos.

En el recuento diferencial citológico de las muestras en el segundo y último tercio de gestación del presente estudio presentó un porcentaje alto de células óseas, principalmente en el segundo tercio de gestación ($22.8 \% \pm 8.19$ para osteoblastos y $1.31\% \pm 0.56$ para osteoclastos) en contraste con lo reportado en mamíferos adultos, donde estas células se observan rara vez a excepción de procesos patológicos que involucren señales hormonales de remodelación ósea (Weiss y Wardrop, 2011) esto se debe al evidente proceso de osteogénesis que ocurre en el desarrollo fetal de la alpaca al igual que en el resto de mamíferos: El hueso fetal rudimentario se llena inicialmente con cartílago, los condrocitos se hipertrofian y promueven la mineralización de la matriz del cartílago en el centro del hueso rudimentario, esto promueve la entrada de células progenitoras, que se convierten en condroclastos que degradan parcialmente el cartílago mineralizado y forman espacios de la médula ósea colonizados por los vasos sanguíneos entrantes. Los progenitores osteoblastos entran en el espacio creado y se adhieren al cartílago restante convirtiéndose en osteoblastos maduros y comienzan la formación de trabéculas óseas (Harvey, 2001).

El índice de maduración eritroide (metarubricitos) fue de 3.28 para el segundo tercio gestacional y 3.47 para el último tercio, esto se aproxima al valor expuesto por Martínez de Merlo (2008) (5.2 ± 1.7). El porcentaje de metarubricitos en el último tercio de gestación ($23.82\% \pm 6.98$) en el presente estudio fue más alto que lo reportado en otros mamíferos (Jain, 1986), este alto porcentaje también fue descrito en llamas adultas por Andreasen *et al.* (1994), esta característica puede ser relacionada a la rápida respuesta eritropoyética que presentan los camélidos sudamericanos frente a procesos anémicos y a la evidencia ocasional de metarubricitos en extendidos de sangre periférica en llamas (Smith *et al.*, 1991; Morin *et al.*, 1993). El porcentaje de macrófagos en el segundo y último tercio de gestación ($2.54\% \pm 0.98$ y $1.44\% \pm 0.7$) pueden estar relacionados con el número alto de metarubricitos, ya que en cada isla eritroide conformada en su mayoría por metarubricitos y demás precursores eritroides, está presente un macrófago encargado de la fagocitosis de los núcleos extruidos para dar origen al eritrocito maduro.

El índice de maduración mieloide (metamielocitos, abastados y segmentados) fue de 9.4 para el segundo tercio gestacional y 6.8 para el último tercio, esto se aleja del valor expuesto por Martínez de Merlo (2008) (4.4 ± 1.4). Esto está relacionado con el porcentaje de células granulocíticas que componen el recuento diferencial de las muestras estudiadas fue de 26.99% para el último tercio de gestación, estos valores son bajos en relación a lo reportado por

Andreasen *et al.* (1994) de 63.22% para llamas adultas, y se acercan a la media (37.9%) en 24 caballos sanos, obtenida por Frankie *et al.* (1982), Este porcentaje bajo de células granulocíticas en el último tercio de gestación obtenidas en el presente estudio está relacionado al alto porcentaje de células de la línea eritroide; debido a la adaptación evolutiva de esta especie a las condiciones adversas de su entorno que conlleva a priorizar el transporte de oxígeno mediante un aumento del recuento total de eritrocitos circulantes y por ende de su producción en los órganos hematopoyéticos como la médula ósea (Fowler y Bravo, 2011).

El porcentaje de macrófagos (**Fig. 7**) en el segundo y último tercio de gestación ($2.54\% \pm 0.98$ y $1.44\% \pm 0.7$) pueden estar relacionados con el número alto de metarubricitos, ya que en cada isla eritroide conformada en su mayoría por metarubricitos y demás precursores eritroides, está presente un macrófago encargado de la fagocitosis de los núcleos extruidos para dar origen al eritrocito maduro. Además las células linfoides (**Fig. 8**) se encontraron en un porcentaje bajo en el recuento diferencial : $0.55\% \pm 1.52$ y 1.36 ± 0.63 para el segundo y último tercio de gestación con respecto a lo reportado por Andreasen *et al.* (1994), lo cual permite deducir que la médula ósea no interviene de forma primaria durante el desarrollo fetal como tejido linfóide, sino que existen otros órganos como el timo e hígado que cumplen este rol desde los primeros estadios embrionarios (Montenegro, 2006; Arias *et al.*, 2011).

El elevado porcentaje de células indiferenciadas de las muestras de médula ósea con respecto a los reportes de otros autores (Andreasen *et al.*, 1994; Tornquist, 2009; Harvey, 2001), puede deberse a que los estudios mencionados fueron realizados en animales adultos, los cuales presentan un desarrollo total de los componentes externos de la médula ósea a evaluar, sin embargo en el presente estudio las estructuras que conforman la médula ósea fetal se encuentran aún en formación, por ende es fácil encontrar restos de células reticulares, vasculares, condrocíticas, etc. Las cuales pierden su forma característica al momento de realizar el extendido, impidiendo su reconocimiento.

La relación mieloide-eritroide en equinos varía de 0.5 a 2.4. En bovinos la relación M/E es baja (0.5-0.6), en cabras se reportaron valores similares y en ovejas la relación M/E es en promedio de 1; los valores bajos en estos rumiantes se correlaciona con la baja concentración de neutrófilos en sangre periférica comparado con otras especies y la velocidad a la que se agotan los neutrófilos

durante procesos inflamatorios (Harvey, 2001; Weiss y Wardrop, 2011). En el presente estudio el elevado porcentaje de precursores eritroides en médula ósea y el bajo porcentaje de células granulocíticas dieron como resultado que la relación mieloide-eritroide (M/E) promedio obtenida para el segundo y último tercio de gestación (**0.47** \pm 0.27 y **0.69** \pm 0.19, respectivamente) se encuentren dentro del rango de 0,5 a 1,11 reportado para alpacas a 4200 metros sobre el nivel del mar (Reynafarje *et al.*, 1968), mientras que a bajos valores de altitud la relación ha sido reportada con rangos de 0.9 a 2.9 en llamas sanas (Andreasen *et al.*, 1994); de esta forma se entiende que los cambios fisiológicos y anatómicos de adaptación a elevadas altitudes tienden influencia sobre los componentes celulares de la médula ósea en alpacas y por consiguiente durante su desarrollo fetal.

VI. CONCLUSIONES

- Se observan componentes celulares hematopoyéticos morfológicamente similares a otros mamíferos domésticos en fetos de alpaca a partir de los 201.5 días de edad gestacional.
- El porcentaje de células eritroides en fase de maduración en fetos de alpaca del último tercio de gestación son más elevados que en otros mamíferos domésticos.
- El porcentaje de células progenitoras mieloides en fetos de alpaca son menores que en otros mamíferos domésticos.
- Existe diferencia en la relación mieloide:eritroide en fetos de alpaca entre el Segundo y el último tercio de gestación.
- Citológicamente, la médula ósea no tendría un rol primario como órgano linfoide durante el desarrollo fetal.

VII. LITERATURA CITADA

1. **Aba MA, Bravo PW, Forsberg M, Kindahl H. 1997.** Endocrine changes during early pregnancy in the alpaca. *Anim Reprod Sci* 47: 273–279.
2. **Abboud CN, Lichtman MA. 2006.** Structure of the marrow and the hematopoietic microenvironment. En: Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushandky K, Prchal JT, eds. *William's Hematology*, 7^a ed. New York: McGraw – Hill. p 29 – 59.
3. **Aceña MC, Liste F, Gascón FM. 1992.** Biopsia de médula ósea en perro, técnica y utilidad diagnóstica. *Clin Vet Pequeq* 12: 36-46.
4. **Adams GP, Ratto MH, Huanca W, Singh J. 2005.** Ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas. *Biol Reprod* 73: 452-457.
5. **Andreasen CB, Gerros TC, Lassen ED. 1994.** Evaluation of bone marrow cytology and stainable iron content in healthy adult llamas. *Vet Clin Pathol* 23:38–42.
6. **Anjos - Afonso F, Bonnet D. 2007.** Flexible and dynamic organization of bone marrow stromal compartment. *Br J Haematol* 139: 373 – 384.
7. **Arias N, Velapatiño B, Hung A, Cok J. 2016.** Cytokines expression in alpacas and llamas exposed to cold stress. *Small Ruminant Research* 141: 135–140.
8. **Arias W, Sandoval N, Chavera A, Manchego A. 2011.** Caracterización de la citoarquitectura esplénica fetal de alpacas (*Lama pacos*). *Rev Inv Vet Perú* 2011; 22 (2): 81-88.
9. **Bakker J, Baum MJ. 2000.** Neuroendocrine regulation of GnRH release in induce ovulators. *Front Neuroendocrin* 21: 220-262.
10. **Baron MH. 2003.** Embryonic origins of mammalian hematopoiesis. *Exp Hematol* 31: 1160 – 1169.
11. **Battinelli EM, Hartwig JH, Italiano JE. 2007.** Delivering new insight into the biology of megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Curr Opin Hematol* 14: 419 – 426.

12. **Battista JM, Tallmadge RL, Stokol T. 2014.** Hematopoiesis in the equine fetal liver suggest immune preparedness. *Inmunogenetics* 66: 635-649.
13. **Bauer C, Rollema HS, Till HW, Braunitzer G. 1980.** Phosphate binding by llama and camel hemoglobin. *J Comp Physiol* 136: 67-70.
14. **Bendezú, W. 1956.** Aspectos histológicos de la Alpaca órganos hematopoyéticos. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 48 p.
15. **Bertrand JY, Giroux S, Golub R. 2005a.** Characterization of purified intraembryonic hematopoietic stem cells as a tool to define their site of origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 134–139.
16. **Bertrand JY, Jalil A, Klaine M. 2005b.** Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac. *Blood* 106: 3004 – 3011.
17. **Braga W, Leyva V, Cochran R. 2007.** The effect of altitude on alpaca (*Lama pacos*) fiber production. *Small Ruminant Research* 68: 323–328.
18. **Bravo PW, Varela, MH.1993.** Prenatal development of the alpaca (*Lama pacos*). *Anim Reprod Sci* 32: 245–252.
19. **Bravo PW, Stewart DR, Lasley BL, Fowler ME. 1996.** Hormonal indicators of pregnancy in llamas and alpacas. *J Am Vet Med Assoc* 208: 2027–2030.
20. **Brenes E, Madrigal K, Pérez F, Valladares K. 2001.** El cluster de los camélidos en el Perú: Diagnóstico competitivo y recomendaciones estratégicas. *Proy And de Comp* 4: 30-39.
21. **Brockus CW. 2011.** Erythrocytes. En: Latimer KS, Mahaffey EA, Prasse KW, eds. *Duncan & Prasse's veterinary laboratory medicine: clinical pathology*. 5ª ed. Ames: Iowa State Press. p 3–45.
22. **Brown BW. 2000.** A review on reproduction in South American camelids. *Anim Reprod Sci* 58: 169-195.
23. **Calvo W. 1968.** The innervation of the bone marrow in laboratory animals. *Am J Anat* 123: 315–328.
24. **Cebra DE, Anderson DE, Tibary A, Van Saun RJ, Johnson LW. 2014.** Llama and alpaca care: Medicine, surgery, reproduction, nutrition, and herd health. 1ª ed. Canadá: Elsevier Health Sciences. 808 p.
25. **Chasis JA, Mohandas N. 2008.** Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood* 112: 470–478.

26. **Chen BX, Yuen ZX, Pan GW. 1985.** Semen induced ovulation in the Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). Journal of Reproduction and Fertility 73: 335-339.
27. **Choi K. 2002.** The hemangioblast: a common progenitor of hematopoietic and endothelial cells. J Hematother Stem Cell Res 11: 91–101.
28. **Corre J, Barreau C, Cousin B. 2006.** Human subcutaneous adipose cells support complete differentiation but not self - renewal of hematopoietic progenitors. J Cell Physiol 208: 282–288.
29. **Coskun S, Chao H, Vasavada H. 2014.** Development of the Fetal Bone Marrow Niche and Regulation of HSC Quiescence and Homing Ability by Emerging Osteolineage Cells. Cell Reports 9: 581–590.
30. **Coskun S, Hirschi KK. 2010.** Establishment and regulation of the HSC niche: Roles of osteoblastic and vascular compartments. Birth Defects Res C Embryo Today 90: 229–242.
31. **Cristofanelli S, Antonini M, Torres D, Polidori P, Renieri C. 2005.** Carcass characteristics of peruvian llama (*Lama glama*) and alpaca (*Lama pacos*) reared in the Andean highlands. Small Ruminant Research 58: 219–222.
32. **Davis GH, Dodds KG, Moore GH, Bruce GD. 1997.** Seasonal effects on gestation length and birth-weight in alpacas. Anim. Reprod Sci 46: 297–303.
33. **Dénes Á, Boldogkoi Z, Uhreczky G. 2005.** Central autonomic control of the bone marrow: multisynaptic tract tracing by recombinant pseudorabies virus. Neuroscience 134: 947–963.
34. **DiMascio L, Voermans C, Ugoezwa M. 2007.** Identification of adiponectin as a novel hemopoietic stem cell growth factor. J Immunol 178: 3511–3520.
35. **Drew ML, Alexander M, Sasser RG. 1995.** Pregnancy determination by use of pregnancy-specific protein-B radioimmunoassay in llamas. J Am Vet Med Assoc 207: 217–219.
36. **Durand MC; Paytán AA. 2018.** La milenaria familia *camiledae* y el nevado huaytapallana. Nat soc 1: 22-25.
37. **Engelhardt W, Dycker CH, Lechner-Doll M. 2007.** Absorption of short-chain fatty acids, sodium and water from the forestomach of camels. J Comp Physiol B 177: 631–640.

38. **Esquivel DF, Montero M, Barros-Rodriguez M. 2018.** Los camélidos sudamericanos: productos y subproductos usados en la región andina. *Actas Iberoamericanas en Conservación Animal* 11: 30-38.
39. **Everds NE. 2007.** Hematology of the laboratory mouse. En: Fox JG, Barthold SW, Davisson MT, eds. *The Mouse in Biomedical Research*. 2ª ed. Boston: Elsevier. p 133–170.
40. **Fernandez-Baca S, Sumar J, Novoa C, Leyva V. 1973.** Relación entre la ubicación del cuerpo lúteo y la localización del embrión en la alpaca. *Rev Inv Pec (IVITA) Univ Nac S Marcos* 2: 131–135.
41. **Fernández-Baca S. 2005.** Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo de la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).
42. **Fischer-Posovszky P, Wabitsch M, Hochberg Z. 2007.** Endocrinology of adipose tissue: an update. *Hormone Metab Res* 39: 314–321.
43. **Fowler M, Bravo W. 2011.** Reproduction. En: John Wiley & Sons, eds. *Medicine and surgery of Camelids*. Iowa: Wiley-Blackwell. p 381-429.
44. **Fowler ME, Olander HJ. 1990.** Fetal membranes and ancillary structures of llamas (*Lama glama*). *Am J Vet Res* 51: 1495-1500.
45. **Fry MM, McGavin MD. 2007.** Bone marrow, blood cells and lymphatic system. En: McGavin MD, Zachary JF, eds. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, 4ª ed. Saint Louis: Mosby. p 743–750.
46. **Gaspar PW. 2000.** The hemopoietic system. En: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, eds. *Schalm's Veterinary Hematology*. 4ª ed. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins. p 63–69.
47. **Gazitua FJ, Corradini P, Ferrando G, Raggi LA, Parraguez VH. 2001.** Prediction of gestacional age by ultrasonic fetometry in llamas (*Lama glama*) and alpaca (*Lama pacos*). *Anim Reprod Sci* 66:81-92.
48. **Giussani DA, Riquelme RA, Sanhueza EM, Hanson MA, Blanco CE, Llanos AJ. 1999.** Adrenergic and vasopressinergic contributions to the cardiovascular response to acute hypoxaemia in the llama fetus. *J Physiol* 515 (Pt 1): 233-241.
49. **Grindem CB, Juopperi TA, Neel JA. 2002.** Cytology of bone marrow. *Vet Clin Small Animals* 32: 1313-1374.

50. **Grindhem CB, Tyler RD, Cowell RL. 2008.** The bone marrow. In: Cowell RL , Tyler RD, Meinkoth JH, DeNicola DB, eds. Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat, 3^a ed . St Louis: Mosby. p 422–450.
51. **Haar JL, Ackerman GA. 1971.** A phase and electron microscopic study of vasculogenesis and erythropoiesis in the yolk sac of the mouse. Anat Rec 170: 199–223.
52. **Harris P, Heath D, Smith P, Williams DR, Ramirez A, Kruger H, Jones DM. 1982.** Pulmonary circulation of the llama at high and low altitudes. Thorax 37: 38-45.
53. **Harvey JW. 2001.** Bone marrow examination. En: Harvey JW. Atlas of Veterinary Hematology: Blood and Bone Marrow of Domestic Animals. 1a ed. Philadelphia: Saunders. p 83-161.
54. **Hermans MHA, Hartsuiker H, Opstelten D. 1989.** An *in situ* study of β - lymphocytopoiesis in rat bone marrow. J Immunol 142: 67–73.
55. **Herrera EA, Reyes RV, Giussani DA, Riquelme RA, Sanhueza EM, Ebensperger G, Casanella P, Méndez N, Ebensperger R, Sepúlveda-Kattan E, Pulgar VM, Cabello G, Blanco CE, Hanson MA, Parer JT, Llanos AJ. 2008.** Carbon monoxide: a novel pulmonary artery vasodilator in neonatal llamas of the Andean altiplano. Cardiovasc Res 77: 197-201.
56. **INEI. instituto nacional de estadística e informatica.2012.** Resultados definitivos. IV censo nacional agropecuario 2012. 2013: 18
57. **Jain N. 1986.** Veterinary hematology. Schalm's. 4^oed. Philadelphia: Lea & Febiger. 1221p.
58. **Ji RP, Phoon CK, Aristiz O. 2003.** Onset of cardiac function during early mouse embryogenesis coincides with entry of primitive erythroblasts into the embryo proper. Circ Res 92: 133–135.
59. **Jones CJ, Wooding FB, Abd-Elnaeim MM, Leiser R, Dantzer V, Stoddart RW. 2000.** Glycosylation in the near-term epitheliochorial placenta of the horse, donkey and camel: a comparative study of interbreeding and non-interbreeding species. J Reprod Fertil 118: 397–405.
60. **Jones CJ, Abd-Elnaeim M, Bevilacqua E, Oliveira LV, Leiser R.2002.** Comparison of uteroplacental glycosylation in the camel (*Camelus dromedarius*) and alpaca (*Lama pacos*). Reproduction 123: 115–126.

61. **Kadwell MM, Fernández M, Stanley HF, Baldi R, Wheeler JC, Rosadio R, Bruford MW. 2001.** Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and alpaca. *Proceedings of the Royal Society of London B* 268: 2575–2584.
62. **Kawamoto H, Ohmura K, Katsura Y. 1997.** Direct evidence for the commitment of hematopoietic stem cells to T, B and myeloid lineages in murine fetal liver. *Intl Immunol* 9: 1011–1019.
63. **Kawamoto H, Ohmura K, Fujimoto S. 1999.** Emergence of T cell progenitors without B cell or myeloid differentiation potential at the earliest stage of hematopoiesis in the murine fetal liver. *J Immunol* 162: 2725–2731.
64. **Kawamoto H, Ikawa T, Ohmura K. 2000.** T cell progenitors emerge earlier than B cell progenitors in the murine fetal liver. *Immunity*: 441–450.
65. **Kilroy GE, Foster SJ, Wu X. 2007.** Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *J Cell Physiol* 212: 702–709.
66. **Kleinschmidt T, März J, Jürgens KD, Braunitzer G. 1986.** Interaction of allosteric effectors with α -globin chains and high altitude respiration in mammals. The primary structure of two tylopod hemoglobins with high oxygen affinity: vicuna (*Lama vicugna*) and alpaca (*Lama pacos*) *Biol Chem. H-S* 367: 153–160.
67. **Kuter DJ, Bain B, Mufti G. 2007.** Bone marrow fibrosis: pathophysiology and clinical significance of increased bone marrow stromal fibers. *Br J Haematol* 139: 351–362.
68. **Lago F, Dieguez C, Gómez-Reino J. 2007.** Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nat Clin Pract Rheumatol* 3: 176–724.
69. **Lam QL, Lu L. 2007.** Role of leptin in immunity. *Cell Mol Immunol* 4: 1–13.
70. **Li O, Hoyos LA, Barrios LM. 2017.** Guía práctica de Patología clínica veterinaria. Lima: FMV-UNMSM. 111p.
71. **Lichtman MA. 1981.** The ultrastructure of the hemopoietic environment of the marrow: a review. *Exp Hematol* 9: 391–410.
72. **Llanos AJ, Riquelme RA, Sanhueza EM, Hanson MA, Blanco CE, Parer JT, Herrera EA, Pulgar VM, Reyes RV, Cabello G, Giussani DA. 2003.** The fetal llama versus the fetal sheep: different strategies to withstand hypoxia. *High Alt Med Biol.* 4: 193-202.

73. **Llanos AJ, Riquelme RA, Herrera EA, Ebensperger G, Krause B, Reyes RV, Sanhueza EM, Pulgar VM, Behn C, Cabello G, Parer JT, Giussani DA, Blanco CE, Hanson MA. 2007.** Evolving in thin air-lessons from the llama fetus in the altiplano. *Respir Physiol Neurobiol* 158: 298-306.
74. **Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y. 2008.** Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocr Rev* 29: 403-440.
75. **Mamani-Linares LW, Cayo F, Gallo C. 2014.** Características de canal, calidad de carne y composición química de carne de llama: una revisión. *Rev Inv Vet Perú* 25(2): 123-150.
76. **Martinez de Merlo EM. 2008.** Atlas de citología clínica del perro y del gato. 1ª ed. Zaragoza: Servet. 408 p.
77. **McGrath K, Palis J. 2008.** Ontogeny of erythropoiesis in the mammalian embryo. *Curr Top Dev Biol* 82: 1-22.
78. **McKercher SR, Torbett BE, Anderson KL. 1996.** Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J* 15: 5647-5658.
79. **McKinnon A, Tinson A. 1992.** Embryo transfer in dromedary camels. *R&W Publications*: 203-208.
80. **Medvinsky AL, Dzierzak EA. 1996.** Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 86: 897-906.
81. **Medvinsky AL, Dzierzak EA. 1998.** Development of the definitive hematopoietic hierarchy in the mouse. *Dev Comp Immunol* 22: 289-301.
82. **Melle L. 2011.** Observational of fetal development in alpacas at specific gestational ages using ultrasound, fetal dissection, and computer aided tomography techniques. *Capstone Experiencie Manuscript of University of Massachusetts*: 1-58.
83. **Mendoza GJ. 2012.** Modelo del a irrigación sanguínea materno fetal en la llama (*Lama glama*) y alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis doctoral. La plata, Argentina: Universidad Nacional de la Plata. 128p.
84. **Mendoza G, Echevarria L, Llerena C, Castro A, Dominguez M. 2013.** Comparación morfológica entre el útero fetal y el útero adulto de la alpaca (*Vicugna pacos*) y la llama (*Lama glama*). *Salud tecnol Vet* 1:1-6.
85. **Montenegro JL. 2006.** Caracterización histológica del timo en fetos de alpacas. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 65 p.

86. **Morin DE, Garry FB, Weiser MG. 1993.** Hematologic Responses in Llamas With Experimentally-Induced Iron Deficiency Anemia. *Vet Clin Pathol* 22: 81-88.
87. **Morrison SJ, and Weissman IL. 1994.** The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1: 661–673.
88. **Naito K, Tamahashi N, Chiba C. 1992.** The microvasculature of the human bone marrow correlated with the distribution of hematopoietic cells: a computer - assisted three - dimensional reconstruction study. *Tohoku J Exp Med* 166: 439–450.
89. **Nance DM, Sanders VM. 2007.** Autonomic innervation and regulation of the immune system. *Brain Behav Immun* 21: 736–745.
90. **Naziji S, Maleki K. 1998.** Biochemical analysis of serum and cerebrospinal fluid in clinically normal adult camels (*Camelus dromedarius*). *Veterinary Science* 65: 83-84.
91. **Olivera L, Zago D, Leiser R. 2003.** Placentation in the alpaca *Lama pacos*. *Anat Embryol* 207: 45-62.
92. **Oostendorp RA, Harvey KN, Kusadasi N. 2002.** Stromal cell lines from mouse aorta- gonad-mesonephros subregions are potent supporters of hematopoietic stem cell activity. *Blood* 99: 1183–1189.
93. **Orleigh AB. 2009.** Interspecies comparison of the effect of ovulation inducing factor (oif) in seminal plasma. Tesis de maestría. Saskatoon: University of Saskatchewan. 69 p.
94. **Oruna EJ. 2016.** Caracterización histológica de la piel en crías de alpacas (*Vicugna pacos*) del centro de investigación y desarrollo de camélidos sudamericanos- Lachocc. Tesis de Ingeniero Zootecnista. Trujillo: Univ. Nac. de Trujillo. 45 p.
95. **Ottersbach K, Dzierzak E. 2005.** The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region. *Dev Cell* 8: 377–387.
96. **Palis J, Robertson S, Kennedy M. 1999.** Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* 126: 5073–5084.
97. **Palis J, Yoder MC. 2001.** Yolk sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Exp Hematol* 29: 927–936.
98. **Payne MWC, Uhthoff HK, Trudel G. 2007.** Anemia of immobility: caused by adipocyte accumulation in bone marrow. *Med Hypoth* 69: 778–786.

99. **Pessa-Morikawa T, Niku M, Livanainen A. 2012.** Fetal bovine bone marrow is a rich source of CD34+ hematopoietic progenitors with myelo-monocytic colony-forming activity. *Developmental and Comparative Immunology* 36: 572-577.
100. **Pinto CE, Martín C, Cid MD. 2010.** Camélidos sudamericanos: clasificación, origen y Características. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 4 (1): 23-36.
101. **Ponzoni RW, Hubbard DJ, Kenyon RV, Tuckwell CD, McGregor BA, Howse A. 1997.** Phenotypes resulting from Huacaya by Huacaya, Suri by Huacaya and Suri by Suri alpaca crossings. *Australian Alpaca Association*: 11–13. Disponible en: <http://dro.deakin.edu.au/eserv/DU:30066046/mcgregorphenotypes-1997.pdf>
102. **Portal Agrario. 2009.** Lima: Ministerio de Agricultura [Internet], [15 marzo 2009]. Disponible en: <http://www.minagri.gob.pe>
103. **Porter RL, Calvi LM. 2008.** Communications between bone cells and hematopoietic stem cells. *Arch Biochem Biophys* 473: 193–200.
104. **Quispe E, Rodríguez T, Iñiguez L, Mueller J. 2009.** Producción de fibra de alpaca, llama, vicuña y guanaco en Sudamérica. *Animal Genetic Resources Information* 45: 1–14.
105. **Quispe E. 2011.** Adaptaciones hematológicas de los camélidos sudamericanos que viven en zonas de elevadas altitudes. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 5(Suppl.1): 01-26.
106. **Raggi LA, Ferrando G. 1998.** Avances en fisiología y adaptación de camélidos sudamericanos. *Avances en ciencias veterinarias* 13: 3-15.
107. **Ratto M, Huanca W, Singh J, Adams G. 2006.** Comparison of the effect of natural mating, LH, and GnRH on interval to ovulation and luteal function in llamas. *Animal Reproduction Science* 91: 299–306.
108. **Reynafarje HC, Faura J, Paredes A, Villavicencio D. 1968.** Erythrokinetics in high-altitude-adapted animals (llama, alpaca, and vicuña). *J Appl Physiol* 24 (1): 93–97.
109. **Rugh R. 1990.** The Mouse: Its Reproduction and Development. 1ª ed. Oxford: Oxford University Press. 85 p.
110. **Samokhvalov IM, Samokhvalova NI, Nishikawa S. 2007.** Cell tracing shows the contribution of the yolk sac to adult haematopoiesis. *Nature* 446: 1056–1061.
111. **San Martín M, Copaira M, Zuniga J, Rodreguez R, Bustinza G, Acosta L. 1968.** Aspects of reproduction in the alpaca. *J. Reprod. Fertil.* 16: 395–399.

112. **Sector Agrario. 2011.** Lima. MINAGRI. Internet. 12 junio 2011. Disponible en: <http://minagri.gob.pe/portal/40-sector-agrario/situacion-de-las-actividades-de-crianza-y-producci/298-camelidos-sudamericanos?start=1>
113. **Sethi JK, Vidal-Puig AJ. 2007.** Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res* 48: 1253–1261.
114. **Sillau A. 1965.** Variaciones hematológicas y de la capacidad de oxígeno de la sangre de alpacas con diferente tiempo de permanencia al nivel del mar. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 25 p.
115. **Skidmore JA, Wooding FP, Allen WR. 1996.** Implantation and early placentation in the one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *Placenta* 17: 253–262.
116. **Smith BB, Reed PJ, Pearson EG. 1991.** Erythrocyte Dyscrasia, Anemia, and Hypothyroidism in Chronically Undersmitten Llamas. *J Am Vet Med Assoc* 198: 81-88
117. **Speck NA, Peeters M, Dzierzak E. 2002.** Development of the vertebrate hematopoietic system. En: Rossant J, Tam PPL, eds. *Mouse Development: Patterning, Morphogenesis, and Organogenesis*. 3^a ed. San Diego: Academic Press. p 191–210.
118. **Sponheimer M, Robinson T, Roeder B, Hammer J, Ayliffe L, Passey B, Cerling T, Dearing D, Ehleringer J. 2003.** Digestion and passage rates of grass hays by llamas, alpacas, goats, rabbits, and horses. *Small Ruminant Res* 48: 149.
119. **Steinberg JD, Olver SC, Davis WC, Arzt J. 2008.** Acute myeloid leukemia with multilineage dysplasia in an alpaca. *Vet Clin Pathol* 37:289–297.
120. **Sumar, J. 1991.** Características de las poblaciones de llamas y alpacas en la sierra sur del Perú. En: Informe de la Mesa Redonda sobre Camélidos Sudamericanos. Lima: GAN-37.
121. **Teitell MA, Mikkola HK. 2006.** Transcriptional activators, repressors, and epigenetic modifiers controlling hematopoietic stem cell development. *Pediatr Res* 59: 33-39.
122. **Tibary A. 2001.** Fertilization, embryo and fetal development in camelids. *Society for Theriogenology* 15: 387–396.
123. **Tiedemann K, van Ooyen B. 1978.** Prenatal hematopoiesis and blood characteristics of the cat. *Anat Embryol* 153: 243-267.
124. **Tober J, Koniski A, McGrath KE. 2007.** The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis. *Blood* 109: 1433–1441.

125. **Tornquist SJ. 2009.** Clinical pathology of llamas and alpacas. *Vet Clin Food Anim* 25: 311-322.
126. **Travlos GS. 2006.** Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol Pathol* 34: 548–565.
127. **Valle I, De La Fuente G, Fondevila M. 2008.** Ciliate protozoa of the forestomach of llamas (*Lama glama*) and alpacas (*Vicugna pacos*) from the Bolivian Altiplano. *Zootaxa* 1703: 62-68.
128. **Vaughan JL, Tibary A. 2006.** Reproduction in female South American camelids: a review and clinical observations. *Small Ruminant Research* 61: 259-281.
129. **Weber RE. 2007.** High-altitude adaptations in vertebrate hemoglobins. *Respir Physiol Neurobiol* 158:132-142.
130. **Weiser MG, Fettman MJ, Van Houten D, Johnson L, Garry F. 1992.** Characterization of erythrocytic indices and serum iron values in healthy llamas. *Am J Vet Res.* 53: 1776-1779.
131. **Weiss DJ, Wardrop KJ. 2011.** Schalm's veterinary hematology. 6^a ed. Iowa: John Wiley & Sons. 1232 p.
132. **Wheeler JC. 2006.** Historia Natural de la Vicuña. En: Vila B, ed. Investigación, conservación y manejo de las vicuñas – Proyecto MACS. Buenos Aires: Proyecto MACS-Argentina-INCO- Unión Europea. p 75-108.
133. **Williams D. 1994.** Adaptation and acclimatisation in humans and animals at high altitude. *Thorax* 49: 9-13
134. **Wilson A, Trumpp A. 2006.** Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* 6: 93–106.
135. **Wolber FM, Leonard E, Michael S. 2002.** Roles of spleen and liver in development of the murine hematopoietic system. *Exp Hematol* 30: 1010–1019.

VIII. APÉNDICE

Apéndice 1. Resultados del hemograma completo de 18 hembras alpacas gestantes de descarte y beneficiadas en el Camal Municipal de Ninacaca, Pasco.

CÓDIGO	Ht (%)	Hb (g/dL)	G. rojos (cell/ μ L)	Leucoc. (cell/ μ L)	Abast. (%)	Neutro. (%)	Valor absoluto	Linf. (%)	Valor absoluto	Eosin. (%)	Valor absoluto	Bas. (%)	Valor absoluto	Mon. (%)	Valor absoluto	Plaquetas (cell/ μ l)
H-01	38	13.9	9' 800,000	7,850	0	47	3689.5	38	2983	13	1020.5	2	157	0	0	360,000
H-02	42	14.5	10' 460,000	12,800	0	49	6272	41	5248	7	896	0	0	3	384	600,000
H-03	42	18.5	9' 400,000	9,600	0	51	4896	39	3744	7	672	1	96	2	192	264,500
H-04	27	13.8	8' 300,000	12,850	0	55	7067.5	32	4112	9	1156.5	2	257	2	257	185,000
H-05	38	15.2	10' 340,000	8,200	1	62	5084	24	1968	13	1066	0	0	0	0	255,000
H-06	46	13.9	11' 100,000	13,450	0	54	7263	34	4573	11	1479.5	0	0	1	134.5	555,000
H-07	39	19.2	13' 700,000	19,700	0	64	12608	29	5713	5	985	1	197	1	197	240,000
H-08	48	17.2	15' 680,000	12,850	0	46	5911	38	4883	14	1799	0	0	2	257	204,000
H-09	39	14.2	14' 900,000	7,350	0	37	2719.5	54	3969	6	441	1	73.5	2	147	374,500
H-10	37	16.2	11' 600,000	8,450	0	48	4056	45	3802.5	7	591.5	0	0	0	0	210,000
H-11	42	14.8	11' 500,000	18,580	0	58	10776.4	25	4645	9	1672.2	3	557.4	5	929	405,000
H-12	40	16	13' 460,000	12,800	0	52	6656	40	5120	7	896	1	128	0	0	270,000
H-13	35	13.8	10' 570,000	15,600	1	26	4056	53	8268	7	1092	4	624	9	1404	184,500
H-14	40	14.9	14' 900,000	12,300	0	44	5412	45	5535	3	369	1	123	7	861	240,000
H-15	47	14.8	15' 500,000	6,300	0	38	2394	43	2709	15	945	3	189	1	63	221,000
H-16	33	12.8	10' 800,000	8,450	0	32	2704	57	4816.5	8	676	1	84.5	2	169	324,000
H-17	42	16.5	12' 800,000	9,600	0	58	5568	28	2688	11	1056	2	192	1	96	305,000
H-18	38	13.8	10' 300,000	18,450	0	67	12361.5	23	4243.5	9	1660.5	1	184.5	0	0	350,000

Apéndice 2. Recuento diferencial de muestras citológicas de médula ósea en fetos de alpaca pertenecientes al primer tercio gestacional.

	NÚMERO DE CELULAS* F-01 (75.2 DÍAS)					NÚMERO DE CELULAS* F-02 (86.7 DÍAS)				
	CONTEO 01	CONTEO 02	CONTEO 03	PROMEDIO	%	CONTEO 01	CONTEO 02	CONTEO 03	PROMEDIO	%
MACRÓFAGOS							2		2	5.45
CELULAS INDIFERENCIADAS	49	18	21	29.33	100	27	45	32	34.67	94.55
		RELACIÓN MIELOIDE/ERITROIDE			0		RELACIÓN MIELOIDE/ERITROIDE			0
TOTAL DE CÉLULAS CONTADAS	49	18	21	29.33	100	27	47	32	36.67	100

	NÚMERO DE CELULAS* F-03 (96.2 DÍAS)				
	CONTEO 01	CONTEO 02	CONTEO 03	PROMEDIO	%
MACRÓFAGOS	2	1	2.00	3.66	
CELULAS INDIFERENCIADAS	48	56	52.67	96.34	100
		RELACIÓN MIELOIDE/ERITROIDE			0
TOTAL DE CÉLULAS CONTADAS	50	57	54.67	100	100

**Se contó el total de células observadas en cada lámina (escasa celuridad)*

Apéndice 3. Recuento diferencial de muestras citológicas de médula ósea en fetos de alpaca pertenecientes al segundo tercio gestacional (F-04, F-05 y F-06).

	NÚMERO DE CELULAS* F-04 (121.4 DÍAS)					NÚMERO DE CELULAS F-05 (138.7 DÍAS)				
	CONTEO 01	CONTEO 02	CONTEO 03	PROMEDIO	%	CONTEO 01	CONTEO 02	CONTEO 03	PROMEDIO	%
OSTEOBLASTOS	125	48	73	82.00	60.67	346	219	304	289.67	57.93
OSTEOCLASTOS	3		2	2.50	1.85	6	9	5	6.67	1.33
MACRÓFAGOS	4	1	2	2.33	1.73	28	17	10	18.33	3.67
CELULAS INDIFERENCIADAS	49	37	59	48.33	35.76	120	255	181	185.33	37.07
		RELACIÓN MIELOIDE/ERITROIDE			0			RELACIÓN MIELOIDE/ERITROIDE		0
TOTAL DE CÉLULAS CONTADAS	181	86	136	135.17	100	500	500	500	500.00	100

**Se contó el total de células observadas en cada lámina (escasa celuridad)*

	NÚMERO DE CELULAS F-06 (141 DÍAS)				
	CONTEO 01	CONTEO 02	CONTEO 03	PROMEDIO	%
OSTEOBLASTOS	284	307	351	314.00	62.80
OSTEOCLASTOS	16	14	19	16.33	3.27
MACRÓFAGOS	4	12	7	7.67	1.53
CELULAS INDIFERENCIADAS	196	167	123	162.00	32.40
		RELACIÓN MIELOIDE/ERITROIDE			0
TOTAL DE CÉLULAS CONTADAS	500	500	500	500.00	100

Apéndice 4. Recuento diferencial de muestras citológicas de médula ósea en fetos de alpaca pertenecientes al segundo tercio gestacional (F-07 y F-08).

	NÚMERO DE CELULAS F-07 (201.5 DÍAS)					NÚMERO DE CELULAS F-08 (219.2 DÍAS)				
	CONTEO 01	CONTEO 02	CONTEO 03	PROMEDIO	%	CONTEO 01	CONTEO 02	CONTEO 03	PROMEDIO	%
OSTEOBLASTOS	210	333	289	277.33	55.47	206	187	254	215.67	43.13
OSTEOCLASTOS	18	10	12	13.33	2.67	17	8	13	12.67	2.53
RUBROBLASTO		3		1.00	0.20	2		1	1.00	0.20
PRORUBRICITO	5	8	6	6.33	1.27	3	1		1.33	0.27
RUBRICITO BASÓFILO	28		24	17.33	3.47	6	4	4	4.67	0.93
RUBRICITOPOLICROMATÓFILO	64	38	34	45.33	9.07	33	28	17	26.00	5.20
METARUBRICITO	58	49	47	51.33	10.27	89	107	87	94.33	18.87
TOTAL DE CÉLULAS ERITROCÍTICAS	155	98	111	121.33	24.27	133	140	109	127.33	25.47
MIELOBLASTO	2		1	1.00	0.20	1			0.33	0.07
PROMIELOCITO		2		0.67	0.13	2	1		1.00	0.20
MIELOCITO NEUTRÓFILO						8	12	6	8.67	1.73
METAMIELOCITO NEUTRÓFILO	4			1.33	0.27	13	17	9	13.00	2.60
ABASTONADO NEUTRÓFILO		4	8	4.00	0.80					
SEGMENTADO NEUTRÓFILO	10	18	19	15.67	3.13	44	29	21	31.33	6.27
MIELOCITO EOSINÓFILO						5	6		3.67	0.73
METAMIELOCITO EOSINÓFILO						11	2	10	7.67	1.53
ABASTONADO EOSINÓFILO						16	8	6	10.00	2.00
SEGMENTADO EOSINÓFILO		4	2	2.00	0.40	17	16	16	16.33	3.27
MIELOCITO BASÓFILO										
METAMIELOCITO BASÓFILO							1		0.33	0.07
ABASTONADO BASÓFILO										
SEGMENTADO BASÓFILO										
TOTAL DE CÉLULAS GRANULOCÍTICAS	16	28	30	24.67	4.93	117	92	68	92.33	18.47
MEGACARIOBLASTO						1			0.33	0.07
PROMEGACARIOCITO										
MEGACARIOCITO							3	1	1.33	0.27
CELULAS LINFOIDES	2		1	1.00	0.20	13	8	16	12.33	2.47
MASTOCITOS										
MACRÓFAGOS	21	18	15	18.00	3.60	3	10	22	11.67	2.33
CELULAS INDIFERENCIADAS	78	13	42	44.33	8.87	10	52	17	26.33	5.27
		RELACIÓN MIELOIDE/ERITROIDE			0.2		RELACIÓN MIELOIDE/ERITROIDE			0.73
TOTAL DE CÉLULAS CONTADAS	500	500	500	500.00	100	500	500	500	500.00	100

Apéndice 5. Recuento diferencial de muestras citológicas de médula ósea en fetos de alpaca pertenecientes al último tercio gestacional (F-09 y F-10).

	NÚMERO DE CELULAS F-09 (251.3 DÍAS)					NÚMERO DE CELULAS F-10 (253.9 DÍAS)				
	CONTEO 01	CONTEO 02	CONTEO 03	PROMEDIO	%	CONTEO 01	CONTEO 02	CONTEO 03	PROMEDIO	%
OSTEOBLASTOS	147	205	183	178.33	35.67	153	141	147	147.00	29.42
OSTEOCLASTOS	6	8	13	9.00	1.80	12	5	8	8.33	1.67
RUBROBLASTO	1		3	1.33	0.27	5	9	6	6.67	1.33
PRORUBRICITO	8	2	6	5.33	1.07	9	13	10	10.67	2.13
RUBRICITO BASÓFILO	22	16	18	18.67	3.73	26	21	31	26.00	5.20
RUBRICITOPOLICROMATÓFILO	20	12	11	14.33	2.87	34	32	28	31.33	6.27
METARUBRICITO	98	103	104	101.67	20.33	115	143	124	127.33	25.48
TOTAL DE CÉLULAS ERITROCÍTICAS	149	133	142	141.33	28.27	189	218	199	202.00	40.43
MIELOBLASTO	1	2	1	1.33	0.27	3	7	4	4.67	0.93
PROMIELOCITO	3	2	5	3.33	0.67	4	6	2	4.00	0.80
MIELOCITO NEUTRÓFILO	3	1	2	2.00	0.40	3	1		1.33	0.27
METAMIELOCITO NEUTRÓFILO	7	4	4	5.00	1.00	1		5	2.00	0.40
ABASTONADO NEUTRÓFILO	12	12	15	13.00	2.60	13	6	21	13.33	2.67
SEGMENTADO NEUTRÓFILO	23	38	19	26.67	5.33	75	82	75	77.33	15.48
MIELOCITO EOSINÓFILO	8	2	14	8.00	1.60	1		1	0.67	0.13
METAMIELOCITO EOSINÓFILO	2		8	3.33	0.67		2		0.67	0.13
ABASTONADO EOSINÓFILO	12	18	7	12.33	2.47	1		1	0.67	0.13
SEGMENTADO EOSINÓFILO	15	10	9	11.33	2.27	12	9	12	11.00	2.20
MIELOCITO BASÓFILO									0.00	0.00
METAMIELOCITO BASÓFILO						1	1		0.67	0.13
ABASTONADO BASÓFILO			1	0.33	0.07	1		1	0.67	0.13
SEGMENTADO BASÓFILO	1			0.33	0.07				0.00	0.00
TOTAL DE CÉLULAS GRANULOCÍTICAS	87	89	85	87.00	17.40	115	114	122	117.00	23.42
MEGACARIOBLASTO	1			0.33	0.07	1			0.33	0.07
PROMEGACARIOCITO		1		0.33	0.07	1	1	1	1.00	0.20
MEGACARIOCITO	2	2	1	1.67	0.33	3	1	4	2.67	0.53
CELULAS LINFOIDES	11	2	4	5.67	1.13		2	3	1.67	0.33
MASTOCITOS		1		0.33	0.07				0.00	0.00
MACRÓFAGOS	8	18	6	10.67	2.13	2	6	3	3.67	0.73
CELULAS INDIFERENCIADAS	89	41	66	65.33	13.07	24	12	24	20.00	4.00
		RELACIÓN MIELOIDE/ERITROIDE			0.62		RELACIÓN MIELOIDE/ERITROIDE			0.58
TOTAL DE CÉLULAS CONTADAS	500	500	500	500.00	100	500	500	500	500.00	100

Apéndice 6. Recuento diferencial de muestras citológicas de médula ósea en fetos de alpaca pertenecientes al último tercio gestacional (F-11 y F-12).

	NÚMERO DE CELULAS F-11 (267.6 DÍAS)					NÚMERO DE CELULAS F-12 (278.7 DÍAS)				
	CONTEO 01	CONTEO 02	CONTEO 03	PROMEDIO	%	CONTEO 01	CONTEO 02	CONTEO 03	PROMEDIO	%
OSTEOBLASTOS	99	113	77	96.33	19.27	31	26	17	24.67	4.93
OSTEOCLASTOS	2	7	12	7.00	1.40	2	1	2	1.67	0.33
RUBROBLASTO	7	9	6	7.33	1.47	7	9	6	7.33	1.47
PRORUBRICITO	12	14	10	12.00	2.40	12	14	10	12.00	2.40
RUBRICITO BASÓFILO	38	26	23	29.00	5.80	38	26	23	29.00	5.80
RUBRICITOPOLICROMATÓFILO	57	60	50	55.67	11.13	62	60	50	57.33	11.47
METARUBRICITO	79	125	78	94.00	18.80	199	225	218	214.00	42.80
TOTAL DE CÉLULAS ERITROCÍTICAS	193	234	167	198.00	39.60	318	334	307	319.67	63.93
MIELOBLASTO	5	2	8	5.00	1.00	5	2	8	5.00	1.00
PROMIELOCITO	9	4	12	8.33	1.67	9	4	12	8.33	1.67
MIELOCITO NEUTRÓFILO	6	3	10	6.33	1.27	6	3	10	6.33	1.27
METAMIELOCITO NEUTRÓFILO	2		9	3.67	0.73	2		9	3.67	0.73
ABASTONADO NEUTRÓFILO	71	72	63	68.67	13.73	71	72	63	68.67	13.73
SEGMENTADO NEUTRÓFILO	25	32	48	35.00	7.00	25	32	28	28.33	5.67
MIELOCITO EOSINÓFILO	3	1	1	1.67	0.33	3	1	1	1.67	0.33
METAMIELOCITO EOSINÓFILO	1		2	1.00	0.20	1		2	1.00	0.20
ABASTONADO EOSINÓFILO	10	4	12	8.67	1.73	10	4	15	9.67	1.93
SEGMENTADO EOSINÓFILO	9	6	15	10.00	2.00	9	6	5	6.67	1.33
MIELOCITO BASÓFILO	1			0.33	0.07		2		0.67	0.13
METAMIELOCITO BASÓFILO				0.00	0.00				0.00	0.00
ABASTONADO BASÓFILO		2	1	1.00	0.20		1		0.33	0.07
SEGMENTADO BASÓFILO	1		1	0.67	0.13			1	0.33	0.07
TOTAL DE CÉLULAS GRANULOCÍTICAS	143	126	182	150.33	30.07	141	127	154	140.67	28.13
MEGACARIOBLASTO		1		0.33	0.07			1	0.33	0.07
PROMEGACARIOCITO		1		0.33	0.07	1	1	2	1.33	0.27
MEGACARIOCITO	1	3	1	1.67	0.33	3		2	1.67	0.33
CELULAS LINFOIDES	12	8	9	9.67	1.93		3	6	3.00	0.60
MASTOCITOS			1	0.33	0.07		1	1	0.67	0.13
MACRÓFAGOS	6	3	12	7.00	1.40		1		0.33	0.07
CELULAS INDIFERENCIADAS	44	4	39	29.00	5.80	4	6	8	6.00	1.20
		RELACIÓN MIELOIDE/ERITROIDE			0.76		RELACIÓN MIELOIDE/ERITROIDE			0.44
TOTAL DE CÉLULAS CONTADAS	500	500	500	500.00	100	500	500	500	500.00	100

Apéndice 7. Recuento diferencial de muestras citológicas de médula ósea en fetos de alpaca pertenecientes al último tercio gestacional (F-13 y F-14).

	NÚMERO DE CELULAS F-13 (288.4 DÍAS)					NÚMERO DE CELULAS F-14 (289.6 DÍAS)				
	CONTEO 01	CONTEO 02	CONTEO 03	PROMEDIO	%	CONTEO 01	CONTEO 02	CONTEO 03	PROMEDIO	%
OSTEOBLASTOS	108	115	154	125.67	25.13	75	58	108	80.33	16.07
OSTEOCLASTOS	6	8	13	9.00	1.80	6	2	8	5.33	1.07
RUBROBLASTO	2		1	1.00	0.20	7	5	7	6.33	1.27
PRORUBRICITO	3	1		1.33	0.27	15	8	18	13.67	2.73
RUBRICITO BASÓFILO	9	24	13	15.33	3.07	33	23	27	27.67	5.53
RUBRICITOPOLICROMATÓFILO	13	48	37	32.67	6.53	59	18	38	38.33	7.67
METARUBRICITO	84	90	76	83.33	16.67	97	135	108	113.33	22.67
TOTAL DE CÉLULAS ERITROCÍTICAS	111	163	127	133.67	26.73	211	189	198	199.33	39.87
MIELOBLASTO	1		1	0.67	0.13	4	1	3	2.67	0.53
PROMIELOCITO	2	1	2	1.67	0.33	1	3	2	2.00	0.40
MIELOCITO NEUTRÓFILO	8	12	6	8.67	1.73	6	6	4	5.33	1.07
METAMIELOCITO NEUTRÓFILO	13	17	9	13.00	2.60	8	16	12	12.00	2.40
ABASTONADO NEUTRÓFILO	25	19	27	23.67	4.73	50	75	58	61.00	12.20
SEGMENTADO NEUTRÓFILO	84	59	31	58.00	11.60	76	87	35	66.00	13.20
MIELOCITO EOSINÓFILO	5	6		3.67	0.73	2	2	5	3.00	0.60
METAMIELOCITO EOSINÓFILO	11	2	10	7.67	1.53	1		1	0.67	0.13
ABASTONADO EOSINÓFILO	16	8	6	10.00	2.00	3	12	3	6.00	1.20
SEGMENTADO EOSINÓFILO	17	16	16	16.33	3.27	3	7	3	4.33	0.87
MIELOCITO BASÓFILO				0.00	0.00		1		0.33	0.07
METAMIELOCITO BASÓFILO		1		0.33	0.07	1		1	0.67	0.13
ABASTONADO BASÓFILO				0.00	0.00				0.00	0.00
SEGMENTADO BASÓFILO				0.00	0.00	1	2		1.00	0.20
TOTAL DE CÉLULAS GRANULOCÍTICAS	182	141	108	143.67	28.73	156	212	127	165.00	33.00
MEGACARIOBLASTO	1			0.33	0.07			1	0.33	0.07
PROMEGACARIOCITO				0.00	0.00		1		0.33	0.07
MEGACARIOCITO		3	1	1.33	0.27	3	3	1	2.33	0.47
CELULAS LINFOIDES	13	8	17	12.67	2.53	5	7	1	4.33	0.87
MASTOCITOS				0.00	0.00				0.00	0.00
MACRÓFAGOS	3	10	22	11.67	2.33	8	12	15	11.67	2.33
CELULAS INDIFERENCIADAS	76	52	58	62.00	12.40	36	16	41	31.00	6.20
		RELACIÓN MIELOIDE/ERITROIDE			1.07		RELACIÓN MIELOIDE/ERITROIDE			0.83
TOTAL DE CÉLULAS CONTADAS	500	500	500	500.00	100	500	500	500	500.00	100

Apéndice 8. Recuento diferencial de muestras citológicas de médula ósea en fetos de alpaca pertenecientes al último tercio gestacional (F-15 y F-16).

	NÚMERO DE CELULAS F-15 (308.7 DÍAS)					NÚMERO DE CELULAS F-16 (311.3 DÍAS)				
	CONTEO 01	CONTEO 02	CONTEO 03	PROMEDIO	%	CONTEO 01	CONTEO 02	CONTEO 03	PROMEDIO	%
OSTEOBLASTOS	97	127	89	104.33	20.87	112	131	79	107.33	21.47
OSTEOCLASTOS	2	8	2	4.00	0.80	2	12	8	7.33	1.47
RUBROBLASTO	8	3	6	5.67	1.13	5	1	5	3.67	0.73
PRORUBRICITO	1	5	10	5.33	1.07	6	4	5	5.00	1.00
RUBRICITO BASÓFILO	18	24	23	21.67	4.33	31	24	17	24.00	4.80
RUBRICITOPOLICROMATÓFILO	57	48	52	52.33	10.47	59	34	38	43.67	8.73
METARUBRICITO	118	119	97	111.33	22.27	97	106	138	113.67	22.73
TOTAL DE CÉLULAS ERITROCÍTICAS	202	199	188	196.33	39.27	198	169	203	190.00	38.00
MIELOBLASTO	5		8	4.33	0.87	1	1		0.67	0.13
PROMIELOCITO	9	1	12	7.33	1.47	2	1	3	2.00	0.40
MIELOCITO NEUTRÓFILO	6	12	10	9.33	1.87	1	7	4	4.00	0.80
METAMIELOCITO NEUTRÓFILO	2	7	9	6.00	1.20	4	11	12	9.00	1.80
ABASTONADO NEUTRÓFILO	71	29	63	54.33	10.87	19	27	61	35.67	7.13
SEGMENTADO NEUTRÓFILO	25	31	28	28.00	5.60	71	78	47	65.33	13.07
MIELOCITO EOSINÓFILO	3	6	3	4.00	0.80	2	3	3	2.67	0.53
METAMIELOCITO EOSINÓFILO	1	2	5	2.67	0.53	1	2	7	3.33	0.67
ABASTONADO EOSINÓFILO	10	8	18	12.00	2.40	12	8	2	7.33	1.47
SEGMENTADO EOSINÓFILO	9	16	21	15.33	3.07	21	7	11	13.00	2.60
MIELOCITO BASÓFILO	1			0.33	0.07		1		0.33	0.07
METAMIELOCITO BASÓFILO		1		0.33	0.07	1			0.33	0.07
ABASTONADO BASÓFILO				0.00			2	1	1.00	0.20
SEGMENTADO BASÓFILO	1		1	0.67	0.13	3			1.00	0.20
TOTAL DE CÉLULAS GRANULOCÍTICAS	143	113	178	144.67	28.93	138	148	151	145.67	29.13
MEGACARIOBLASTO			1	0.33	0.07	1	1		0.67	0.13
PROMEGACARIOCITO			2	0.67	0.13			1	0.33	0.07
MEGACARIOCITO	1	3	2	2.00	0.40	2	1	4	2.33	0.47
CELULAS LINFOIDES	11	8	6	8.33	1.67	8	7	11	8.67	1.73
MASTOCITOS			1	0.33	0.07		1		0.33	0.07
MACRÓFAGOS	12	10	3	8.33	1.67	2	3	9	4.67	0.93
CELULAS INDIFERENCIADAS	32	32	28	30.67	6.13	37	27	34	32.67	6.53
		RELACIÓN MIELOIDE/ERITROIDE			0.74		RELACIÓN MIELOIDE/ERITROIDE			0.77
TOTAL DE CÉLULAS CONTADAS	500	500	500	500.00	100	500	500	500	500.00	100

Apéndice 9. Recuento diferencial de muestras citológicas de médula ósea en fetos de alpaca pertenecientes al último tercio gestacional (F-17 y F-18).

	NÚMERO DE CELULAS F-17 (334 DÍAS)					NÚMERO DE CELULAS F-18 (337.1 DÍAS)				
	CONTEO 01	CONTEO 02	CONTEO 03	PROMEDIO	%	CONTEO 01	CONTEO 02	CONTEO 03	PROMEDIO	%
OSTEOBLASTOS	149	136	96	127.00	25.40	97	108	184	129.67	25.93
OSTEOCLASTOS	2	9	5	5.33	1.07	13	8	13	11.33	2.27
RUBROBLASTO	1		6	2.33	0.47	7	5	5	5.67	1.13
PRORUBRICITO	14	6	2	7.33	1.47	3	1	9	4.33	0.87
RUBRICITO BASÓFILO	29	34	35	32.67	6.53	28	34	16	26.00	5.20
RUBRICITOPOLICROMATÓFILO	76	68	85	76.33	15.27	73	28	17	39.33	7.87
METARUBRICITO	86	98	178	120.67	24.13	163	118	96	125.67	25.13
TOTAL DE CÉLULAS ERITROCÍTICAS	206	206	306	239.33	47.87	274	186	143	201.00	40.20
MIELOBLASTO	2	1		1.00	0.20	1			0.33	0.07
PROMIELOCITO	2	5	2	3.00	0.60	2	1		1.00	0.20
MIELOCITO NEUTRÓFILO	2	12	5	6.33	1.27	8		6	8.67	1.73
METAMIELOCITO NEUTRÓFILO	3	9	8	6.67	1.33	13	17	9	13.00	2.60
ABASTONADO NEUTRÓFILO	42	26	17	28.33	5.67	12	59	37	36.00	7.20
SEGMENTADO NEUTRÓFILO	38	49	28	38.33	7.67	36	26	31	31.00	6.20
MIELOCITO EOSINÓFILO	5	2		2.33	0.47	5	6		3.67	0.73
METAMIELOCITO EOSINÓFILO	7	5		4.00	0.80	1	2	10	4.33	0.87
ABASTONADO EOSINÓFILO	16	9	7	10.67	2.13	6	8	6	6.67	1.33
SEGMENTADO EOSINÓFILO	3	18	3	8.00	1.60	7	16	16	13.00	2.60
MIELOCITO BASÓFILO	1			0.33	0.07	1			0.33	0.07
METAMIELOCITO BASÓFILO				0.00	0.00	1	1	1	1.00	0.20
ABASTONADO BASÓFILO		1		0.33	0.07				0.00	0.00
SEGMENTADO BASÓFILO	2			0.67	0.13	1		3	1.33	0.27
TOTAL DE CÉLULAS GRANULOCÍTICAS	123	137	70	110.00	22.00	94	148	119	120.33	24.07
MEGACARIOBLASTO				0.00	0.00	1			0.33	0.07
PROMEGACARIOCITO	2	1		1.00	0.20		1		0.33	0.07
MEGACARIOCITO	2	1	2	1.67	0.33		3	1	1.33	0.27
CELULAS LINFÓIDES	4	1	6	3.67	0.73	8	8	10	8.67	1.73
MASTOCITOS				0.00	0.00			1	0.33	0.07
MACRÓFAGOS	6			2.00	0.40	3	10	12	8.33	1.67
CELULAS INDIFERENCIADAS	6	9	15	10.00	2.00	10	28	17	18.33	3.67
		RELACIÓN MIELOIDE/ERITROIDE			0.46		RELACIÓN MIELOIDE/ERITROIDE			0.60
TOTAL DE CÉLULAS CONTADAS	500	500	500	500.00	100	500	500	500	500.00	100

Apéndice 10. Mediciones de los diámetros longitudinales y trasversales para cada tipo celular observado en muestras citológicas de médula ósea en fetos de alpaca.

	Medida 01 (μm)		Medida 02 (μm)		Medida 03 (μm)		Medida 04 (μm)		Medida 05(μm)	
	Diámetro L	Diámetro T	Diámetro L	Diámetro T	Diámetro L	Diámetro T	Diámetro L	Diámetro T	Diámetro L	Diámetro T
OSTEOBLASTOS	25.765	14.988	19.405	15.27	27.411	13.498	25.993	13.565	31.605	17.194
OSTEOCLASTOS	47.454	75.132	58.273	37.29	80.274	73.179	75.254	51.269	55.149	61.379
RUBROBLASTO	18.615	15.444	19.753	20.452	21.021	18.212	19.254	17.546	21.211	19.587
PRORUBRICITO	12.991	13.353	11.089	10.531	11.741	13.856	14.794	13.112	12.964	12.61
RUBRICITO BASOFILO	10.037	10.285	10.467	10.969	9.097	10.271	10.172	10.591	10.024	9.291
RUBRICITOPOLICROMATÓFILO	8.539	8.774	8.639	8.639	8.154	8.004	7.816	7.741	7.329	7.6285
METARUBRICITO	5.232	4.783	5.4	4.544	6.278	5.797	4.952	5.551	4.889	4.96
MIELOBLASTO	15.275	16.643	14.87	15.673	14.469	16.623	14.431	15.251	14.157	17.712
PROMIELOCITO	21.197	17.68	18.165	16.672	18.587	16.135	16.145	14.894	18.254	16.458
MIELOCITO	12.63	12.148	14.08	13.732	12.702	11.018	14.541	12.202	13.754	13.254
METAMIELOCITO	9.862	10.316	11.947	10.229	10.583	9.292	13.245	14.124	11.254	10.145
ABASTONADO	8.395	9.113	10.827	12.357	11.313	9.051	7.294	8.213	8.151	8.266
SEGMENTADO	8.023	9.114	12.258	9.256	8.256	10.587	11.256	10.256	8.589	7.575
MIELOCITO	13.711	13.54	13.048	13.981	12.365	13.258	11.254	10.547	12.521	15.258
METAMIELOCITO	11.254	12.254	12.568	9.125	12.258	10.258	9.154	14.256	13.214	10.254
ABASTONADO	10.256	11.254	9.587	7.154	10.254	13.652	12.236	11.254	13.258	10.654
SEGMENTADO	12.365	9.568	8.214	8.587	9.1254	9.45	8.254	8.654	10.254	11.254
MIELOCITO	10.294	11.196	13.737	13.472	16.547	15.214	12.547	16.642	13.245	12.365
METAMIELOCITO	10.173	8.831	11.454	12.451	14.657	10.254	11.21	9.214	12.654	10.658
ABASTONADO	9.848	12.369	12.658	10.236	11.258	10.658	9.5874	8.254	11.021	10.258
SEGMENTADO	9.547	10.254	7.584	10.317	9.154	12.214	9.124	10.345	9.458	10.254
MEGACARIOBLASTO	43.145	49.458	48.214	43.214	47.214	48.587	50.125	58.214	43.258	42.135
PROMEGACARIOCITO	60.657	65.154	72.256	68.879	61.589	58.584	57.256	69.124	73.258	67.191
MEGACARIOCITO	80.898	76.271	74.486	67.547	82.381	76.457	92.256	86.256	75.102	78.589
CELULAS LINFÓIDES	7.632	8.939	10.021	9.854	8.211	8.458	13.214	12.254	12.547	10.547
MASTOCITOS	11.873	9.269	10.254	11.201	8.125	9.125	8.256	8.214	8.125	7.569
MCRÓFAGOS	18.217	14.257	17.145	19.258	18.214	15.124	14.56	16.254	17.579	13.256
CELULAS INDIFERENCIADAS	9.125	6.214	7.256	15.148	8.256	6.254	13.254	10.255	12.254	11.254

Apéndice 11. Estadísticos de la Prueba de Mann-Whitney aplicado a los valores de la relación Mieloide Eritroide del segundo y último tercio de gestación, con un nivel de significación del 5%; dónde el valor de p (Sig. Asintótica) es 0.014 por lo que se concluye que la relación Mieloide Eritroide difiere entre el segundo y último tercio de gestación.

U de mann-Whitney *	5
W de Wilcoxon	20
Z	-2.458
Sig. Asintótica (bilateral)(p)	0.014
Sig. Exacta (unilateral)	0.013**

*: Variable de agrupación: tercio de gestación

**: No corregido para empates